UNIVERSITÉ DE PARIS
M. G./J. C. — 1056
Année 1968

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série U — N°

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention Pharmacie)

par

Christian WIRTH

soutenue le 16 Mai 1968

TITRE DE LA THÈSE

CONTRIBUTION
A L'EMPLOI DE LA THROMBO-ÉLASTOGRAPHIE DANS LA MESURE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE

JURY : MM. J. COURTOIS, Président
Y. RAOUL, P. DELAVEAU } Examinateurs

UNIVERSITÉ DE PARIS
M. G./J. C. — 1056
Année 1968

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série U — N°

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention Pharmacie)

par

Christian WIRTH

soutenue le 16 Mai 1968

TITRE DE LA THÈSE

CONTRIBUTION
A L'EMPLOI DE LA THROMBO-ÉLASTOGRAPHIE DANS LA MESURE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE

JURY : **MM. J. COURTOIS, Président**
Y. RAOUL
P. DELAVEAU } **Examinateurs**

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538115_0007

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

✵ Légion d'Honneur.
O Officier.
C. Commandeur.

ADMINISTRATION

Malangeau (P.)	Doyen.
Guillot (M.)	Assesseur, O. ✵.
Delaveau (P.)	Assesseur.
Rodineau (L.)	Secrétaire Général, ✵
Ferrari (Mme S.)	Attaché Principale.
Jeandel (L.)	Attaché.
Espinasse (Mme M.-L.)	Attaché.
Brenn (A.)	Attaché, ✵.
Jacob (A.)	Attaché, ✵.
Mur (Mme A.-M.)	Attaché.
Frizol (Mlle E.)	Attaché.
Trican (J.)	Attaché.

PROFESSEURS HONORAIRES

Launyo (L.)	O. ✵.
Fleury (P.)	O. ✵.
Picon (M.)	O. ✵.

PROFESSEURS

Janot (M.-M.), O. ✵, Membre de l'Institut	Pharmacie galénique (T).
Valette (G.), O. ✵	Pharmacodynamie (T).
Paris (R.), ✵	Matière médicale (T).
Guillot (M.), O. ✵	Physique (T).
Gautier (J.-A.), O. ✵	Chimie organique (T).
Lambin (Mlle S.), ✵	Microbiologie (T).
Raoul (Y.), ✵	Physiologie (T).
Courtois (J.), ✵	Chimie biologique (T).
Domange (L.), O. ✵	Chimie générale et minérale (T).
Truhaut (R.), O. ✵	Toxicologie (T).
Morette A., ✵	Hydrologie (T).
Cavier (R.), ✵	Parasitologie (T).
Quevauviller (A.), ✵	Hygiène et Education sanitaire (T).
Moreau (R.), ✵	Pharmacie chimique (T).
German (A.)	Virologie et Sérologie (T).
Piette (M.), ✵	Biologie sanguine, Hématologie (T).
Malangeau (P.)	Chimie analytique (T).
Girard (M.), ✵	Biochimie appliquée (T).
Dillemann (G.)	Législation, Déontologie et Histologie de la Pharmacie (T).

Deysson (G.)	Botanique (T).
Michel (R.)	Endocrinologie (T).
Flahaut (J.)	Minéralogie (T).
Renault (J.)	Chimie organique (T).
Le Hir (A.)	Pharmacie galénique (T).
Boudène (C.)	Toxicologie et Hygiène industrielle (T).
Dalaveau (P.)	Matière médicale et Séméiologie.
Laruelle (P.)	Physique.
Rossignol (P.)	Pharmacodynamie.
Mangeot (A.)	Pharmacie galénique industrielle.
Cohen (Y.)	Pharmacodynamie.
Renault (H.)	Physique.
Bourdon (R.)	Chimie analytique.
Reynaud (P.)	Pharmacie chimique.
Le Moan (R.)	Toxicologie.
Poisson (J.)	Pharmacie galénique.
Leclerc (M.)	Hématologie.

MAITRES DE CONFÉRENCES

Paoletti (C.)	Toxicologie.
Desvignes (A.)	Cryptogamie et Technique bactériologique.
Percheron (F.)	Chimie biologique.
Savel (J.)	Biologie animale.
Bory (M.)	Microbiologie
Miocque (M.)	Chimie organique.
Guignard (J.-L.)	Botanique générale.
Gounelle (J.-C.)	Physiologie.
Binet (P.)	Biologie animale.
Combet-Farnoux (C.)	Chimie organique.
Plat (Mme M.)	Législation et Déontologie pharmaceutique.
Delacoux (E.)	Pharmacie chimique.
Adolphe (C.)	Physique.
Guernet (M.)	Chimie analytique et Bromatologie.
Didry (J.)	Mathématiques.
Khodadad (P.)	Chimie minérale et Minéralogie.
Perles (R.) (F.F.)	Chimie biologique.
Yonger (J.) (F.F.)	Chimie analytique.
Rivet (J.) (F.F.)	Chimie générale et minérale.
Hazebroucq (F.F.)	Physique.
Etienne (J.) (F.F.)	Mathématiques.
Mestre (J.) (F.F.F)	Botanique.
Bourrinet (P.) (F.F.)	Hygiène, Education sanitaire.
Souleau (Ch.) (F.F.)	Chimie générale et minérale.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Agneray (J.)	Chimie biologique.
Astin (C.) (F.F.)	Physique.

Blanc (Mme J.)	Chimie organique.
Barnier (Mme S.)	Mathématiques.
Besançon (F.F.)	Mathématiques.
Bournique (Mlle C.) (F.F.)	Physiologie végétale.
Bernard (Mlle J.)	T.P. Microbiologie, 4e année.
Biget (Mme M.-P.)	Mathématiques.
Carlier (A.)	C.E.S. Pharmacie galénique industrielle.
Cénac (Mme J.) (F.F.)	C.E.S. Parasitologie pharmaceutique et technique.
Charpentier (Mme M.)	Chimie préparation.
Choix (Mlle M.)	Pharmacie galénique.
Clair (Mlle G.) (F.F.)	Essais des médicaments végétaux.
Dagron (C.)	Chimie organique.
Delcourt (A.)	Botanique.
Compagnon (P.) (F.F.)	Chimie organique.
Davy (Mme J.) (F.F.)	C.E.S. Biochimie.
Decaudin (Mlle M.-T.)	Parasitologie.
Dreux (C.)	C.E.S. Electrochimie appliquée à l'analyse.
Dumant (Mlle G.)	C.E.S. Contrôle des médicaments (physico-chimie).
Dupont (Mme C.)	Pharmacodynamie.
Etienne (G.)	Pharmacie galénique.
Fleury (Mlle S.)	E.D. Chimie analytique.
Foglietti (Mlle M.-J.)	Chimie biologique.
Goursat (Mlle M.-J.) (F.F.)	Botanique.
Gayral (P.) (F.F.)	T.P. Zoologie.
Hamon (M.)	Chimie analytique.
Harispe (J.), ✻	Chimie organique.
Henry (J.)	Chimie.
Hubert (Mme J.)	C.E.S. Bactériologie pharmaceutique et technique.
Jund (Mlle Y.)	C.E.S. Immunologie générale et appliquée.
Julien (R.) (F.F.)	Chimie minérale, 1re année.
Laroche (J.)	Physique.
Leboeuf (M.) (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie chimique et galénique.
Léger (Mme N.)	Parasitologie.
Lalégérie (P.) (F.F.)	C.E.S. Biochimie.
Le Duc (Mme Y.)	T.P. Chimie, 4e année.
Leluc (R.)	Microbiologie.
Lemonnier (A.)	Chimie analytique.
Levillain (P.)	Chimie analytique.
Likforman (J.)	Physique.
Longéviale (Mlle M.)	Botanique.
Maccario (J.) (F.F.)	Mathématiques.
Mandereau (J.)	C.E.S. Pharmacotechnie chimique et galénique.
Mahuzier (J.) (F.F.)	Chimie analytique.
Martin-Frère (H.)	Chimie générale et minérale, 1re année.
Michelet (A.) (F.F.)	Chimie minérale.

Morin (Mlle M.)	C.E.S. Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments.
Moulin (P.) (F.F.)	Physique.
Notteghem (Mme M.) (F.F.)	Zoologie.
Nguyen Phu Lich (F.F.)	C.E.S. Toxicologie et Etudes sanitaires.
Paris (M.)	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (biologie).
Pestis (J.)	Biologie animale.
Poullain (P.)	C.E.S. Hématologie.
Prat (Mme M.-T.)	Mathématiques.
Rodier (N.) (F.F.)	Physique.
Rollen (Mlle A.), ✻	Botanique.
Rousselet (Mlle R.)	Essais des drogues végétales.
Robert (Mme M.)	C.E.S. Immunologie générale et appliquée.
Rousselet (F.)	Biochimie appliquée.
Seiller (Mme M.) (F.F.)	Pharmacie galénique industrielle.
Strupler (Mlle N.)	Chimie générale et minérale.
Truong Cong Trieu	Chimie analytique.
Troupel (Mme S.) (F.F.)	Chimie.
Vierfond (J.-M.) (F.F.)	E.D. Chimie organique.
Villers (J.) (F.F.)	Physique.

BIBLIOTHÈQUE

Ruyssen (Mlle Y.)	Conservateur en Chef, ✻.
Lavaud (Mlle S.)	Conservateur, ✻.
Desgrippes (Mme A.)	Conservateur.
Bouvresse (Mlle A.-M.)	Bibliothécaire.

A mes parents

A mon épouse

A mon fils

A Monsieur le Professeur J.-E. COURTOIS,

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie,
Membre de l'Académie de Médecine,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

En témoignage de notre profonde et respectueuse gratitude pour avoir bien voulu guider cette thèse et pour le grand honneur qu'il nous a fait d'accepter la présidence du jury.

A Monsieur le Professeur Y. Raoul,

Professeur de Physiologie à la Faculté de Pharmacie,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

Qui a bien voulu faire partie de notre jury de thèse.
Qu'il reçoive l'expression de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur P. Delaveau,

Professeur de Matière médicale et de Séméiologie à la Faculté de Pharmacie.

Qui a bien voulu accepter de juger notre travail.
Qu'il trouve ici la marque de notre sincère reconnaissance.

A Monsieur A. Uzan,

Qui nous a constamment guidé dans nos travaux et nous a fait bénéficier de son expérience scientifique.
En témoignage de notre particulière reconnaissance.

A Monsieur le Docteur M. Samama,

Qui a facilité par ses conseils nos premiers pas en hématologie, et nous a si aimablement encouragé.
En témoignage de notre vive gratitude.

A Messieurs les Pharmaciens-Chimistes,

E. Le Floch,

Pharmacien-Chimiste, Général,
Chef de Laboratoire du Service de Santé des Armées.

P. Acker,

Pharmacien-Chimiste, Lieutenant-Colonel,
Chef du Laboratoire du Service de Santé des Armées.

P. Ramel,

Pharmacien-Chimiste, Commandant,
Chef de Laboratoire du Service de Santé des Armées.

Qui nous ont permis de réaliser dans leur laboratoire de l'Inspection technique des Subsistances la majeure partie de nos expériences thrombo-élastographiques.

Qu'ils veuillent bien accepter l'expression de nos remerciements respectueux.

CONTRIBUTION
A L'EMPLOI DE LA THROMBO-ÉLASTOGRAPHIE DANS LA MESURE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE

AVANT-PROPOS
SUR LA TROMBO-ÉLASTOGRAPHIE

La thrombo-élastographie selon HARTERT (1947) [220 à 242] est une méthode physique d'étude en continu de la coagulation, permettant l'observation visuelle et l'enregistrement photographique des différentes phases de ce processus (*).

La coagulation est effectuée dans des cuves non mouillables, animées d'un mouvement de rotation horizontale périodique. Dans la cuve plonge un cylindre explorateur suspendu par un fil de torsion porteur d'un miroir qui réfléchit un faisceau lumineux. Au fur et à mesure que se produit la coagulation, le miroir se trouve entraîné dans un mouvement de rotation et le faisceau qu'il réfléchit décrit une courbe enregistrée par le kymographe. Cette courbe caractéristique ou thrombo-élastogramme est en forme de diapason. Le thrombo-élastogramme donne une image du phénomène global de la coagulation qui peut être suivie visuellement sur l'échelle ou être appréciée après le développement du papier photographique (*figures* 1 *et* 2).

Divers paramètres du tracé thrombo-élastographique ont été adoptés comme constantes de mesure, caractéristiques de la coagulation [358]. D'autres ont été retenus pour l'appréciation des tracés obtenus au cours de la fibrinolyse [134]. Dans le rappel suivant, nous définirons les « constantes » retenues au cours de ce travail (*figure* 3).

(*) Nos sincères remerciements vont à Monsieur CLIDI, représentant la Société Hellige, qui a bien voulu mettre à notre disposition un thrombo-élastographe et nous permettre ainsi de confirmer les résultats obtenus avec un premier appareil.

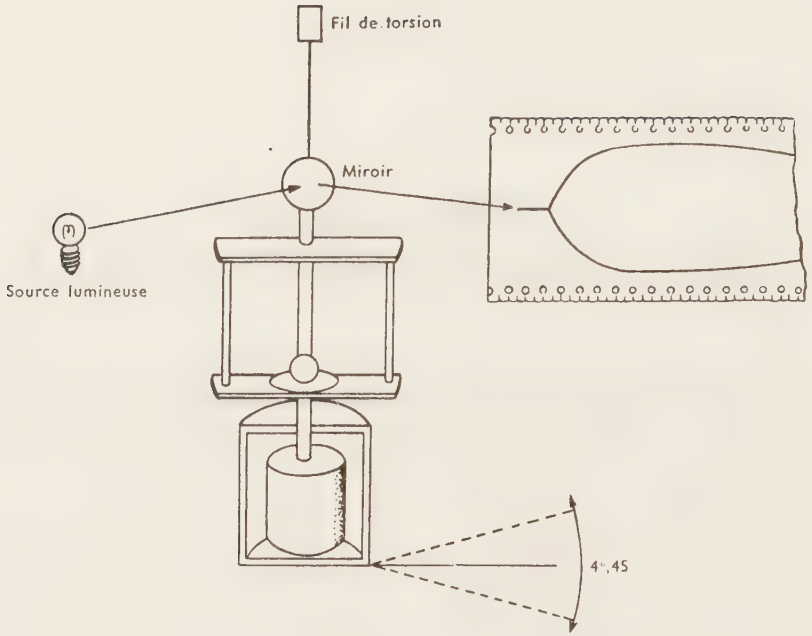


FIG. 1. — Schéma de l'enregistrement thrombo-élastographique selon MANDELLI [363].

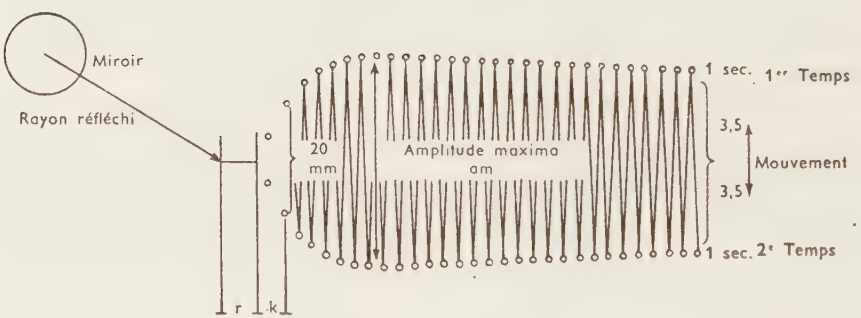


FIG. 2. — Schéma de formation du thrombo-élastogramme selon MANDELLI [363].

CONSTANTES DES DIAGRAMMES DE COAGULATION

1. Constante r [34], [220], [225], [226], [227], [234], [518].

Le tracé normal ou thrombo-élastogramme est caractérisé par un segment de droite qui représente la distance qui sépare le temps « 0 » de l'opération thrombodynamographique et le début de l'enregistrement de la coagulation aupoint d'écartement 1 mm. La mesure de ce segment en mm définit une constante « *r* » ou constante de thromboplastine. L'écartement de la droite en deux courbes qui forment un diapason est l'enregistrement de la coagulation proprement dite.

2. Constante am [220], [225],]227], [234], [237], [518].

Cette courbe en diapason présente un écartement maximum qui est appelé « amplitude maxima » (*am*) du diagramme. Cette amplitude mesurée en mm marque le degré de coagulation maximale du caillot avant la rétraction.

3. Constante k [220], [225], [227], f234], [518].

Elle définit la constante de thrombine. Cette constante de thrombine, désignée par la lettre « *k* », correspond arbitrairement à la distance en mm comprise entre la fin de « *r* » et l'axe transversal du tracé sur lequel l'écartement des deux branches courbes atteint 20 mm. Cette norme a été choisie par Hartert en se référant à l'amplitude maximale d'un plasma rigoureusement exempt de plaquettes.

4. Angle α et tangente α [368].

Après la définition des constantes longitudinales et transversales, sont exprimées deux constantes longitudinales dont les valeurs sont celles de l'angle α (angle formé par la tangente du point O du diapason et par l'axe de symétrie de la figure) et de sa tangente (tangente α). Bien que peu utilisée, cette dernière

constante permet le calcul d'un indice dit indice de coagulabilité Ic, proposé par Della Santa et Duraffourd [129 à 132].

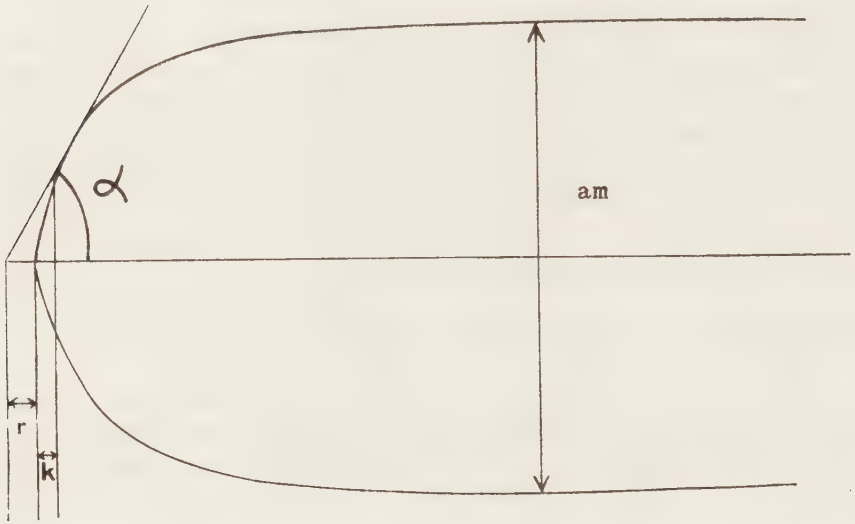


Fig. 3. — Schéma des indices thrombo-élastographiques de coagulation.

CONSTANTES DES DIAGRAMMES DE FIBRINOLYSE

De nombreux auteurs se sont attachés aux différents modes d'expression des indices de lyse. Certains ont adopté le temps de lyse [134], d'autres l'aire de lyse [55] et d'autres enfin la diminution de l'amplitude (en pourcentage) par rapport à l'amplitude maxima [91], [93]. Le temps de lyse a été le plus souvent adopté (*cf. tableau* XVI).

1. Temps de lyse [123], [134], [547], [548].

Différentes constantes ont été calculées soit à partir du début de la coagulation jusqu'à l'apparition de la lyse totale [50], soit à partir de l'amplitude maxima ou à partir de l'amplitude

de 10 mm jusqu'à la lyse totale [134]. Pratiquement, dans la mesure du temps de lyse, l'erreur est moins importante (*) si l'on mesure la lyse jusqu'au moment où l'écartement est de 2 mm, que si on l'estime à l'apparition du trait plein et continu.

D'autre part, le temps de coagulation augmentant avec la dose d'enzyme fibrinolytique ajoutée [182], [184], nous préférons exprimer le temps de lyse à partir du point origine O.

En conclusion, le temps de lyse adopté est exprimé en minutes en divisant par deux (**) la longueur en millimètres de l'origine du tracé à l'écartement 2 mm.

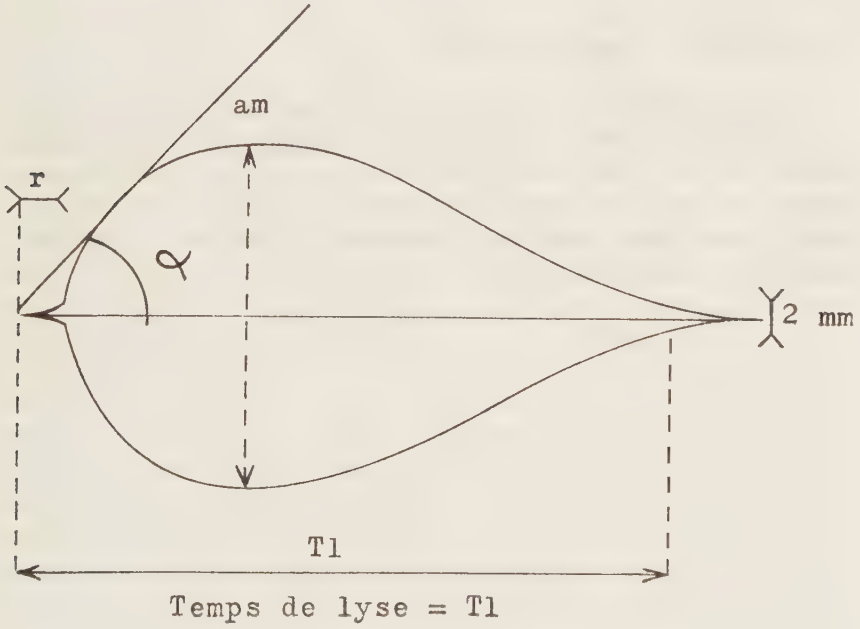


FIG. 4. — Schéma des constantes de lyse.

(*) M. SAMAMA : Communication personnelle.

(**) La vitesse de déroulement du papier enregistreur est de 2 mm/minute.

2. Aire de lyse.

L'intégration totale de la surface ne semble pas avoir été jusqu'à présent proposée. En revanche, le produit d'une constante longitudinale par une constante transversale ($am/2$) conduit au calcul d'une aire de lyse proposée par Bertrand et coll. [55].

3. Variation de l'amplitude.

La diminution de l'amplitude a été envisagée comme critère de mesure de l'activité fibrinolytique par Cacciola et coll. [91], [92].

4. Tangente de l'angle de lyse.

En se rejoignant les branches du diapason forment un angle qui pourrait se prêter à une mesure aussi bien que l'angle de coagulation α. Cette mesure ne semble pas avoir été proposée jusqu'à présent. Nous avons envisagé de l'utiliser au cours de notre travail. Le mode de détermination de cette constante sera décrit au chapitre II.

INTRODUCTION

Depuis sa découverte par Hartert [220], *le thrombo-élastographe a apporté un réel progrès dans l'étude dynamique de la coagulation sanguine. En France,* Leroux [330], *dans sa thèse, a attribué à cette méthode le terme de thrombodynamographie en se fondant sur l'exacte définition des propriétés physiques du caillot* [119]. Marchal *et coll. ont précisé les multiples applications hématologiques de la méthode. L'ensemble de leurs travaux a été rassemblé dans un Atlas* [368].

Cette méthode rend possible une exploration globale de la coagulation, plus précise que la mesure du temps de formation du caillot ou que d'autres procédés physico-chimiques tels que la mesure de la viscosité ou celle de la transparence du caillot. Grâce à des conditions expérimentales constantes et reproductibles, la thrombo-élastographie permet un enregistrement graphique continu de la transformation du fibrinogène en fibrine. Les variations des constantes du tracé, en fonction des différents facteurs susceptibles de modifier les qualités du caillot, ont été bien étudiées par différents auteurs [135], [368], [449], [506] *qui ont ainsi contribué à l'emploi de cette méthode pour le diagnostic des syndromes hémorragiques* [136], [137], [222], [230], [365], [366], [525] *ou des syndromes thrombo-emboliques* [34], [49], [87], [129 *à* 133], [142], [364], [369].

Par ailleurs, dès 1953, Von Kaulla *et* Wiener [559], [560] *signalent l'intérêt de l'emploi du thrombo-élastographe dans l'étude de la fibrinolyse* [99], [180], [414].

Ceci est d'autant plus important que, vers la même période, des cliniciens, en particulier Soulier, Mathey *et coll.* [509],

publient leurs premières observations sur des accidents hémorragiques cataclysmiques liés à une fibrinolyse aiguë. Dès lors, le rôle de la fibrinolyse dans le déclenchement d'hémorragies médicales, transfusionnelles, obstétricales ou chirurgicales est bien établi [470]. *Ceci impose au laboratoire un dépistage rapide dont dépend, en particulier, la thérapeutique antifibrinolytique* [451].

Pourtant l'utilisation de la thrombo-élastographie dans la mesure de la fibrinolyse reste limitée et présente un caractère qualitatif [451]. *D'autres méthodes* [30], [321], *basées sur la mesure du temps de lyse, ou sur la mesure de la surface de lyse après dépôt des euglobulines plasmatiques sur un plateau de fibrine, sont semi-quantitatives et d'un usage très fréquent. Quant au dosage par la méthode caséinolytique, il reste une méthode de contrôle des préparations enzymatiques* [3], [20], *mais son application aux euglobulines plasmatiques* [406] *est rarement utilisée.*

Une des raisons pour laquelle les études sur la fibrinolyse, par thrombo-élastographie, ont été conduites de façon moins systématique que celles sur la coagulation, semble être le fait, souligné par Astrup [160], *que les tracés de fibrinolyse sont difficiles à interpréter lorsqu'ils ne se rapportent pas à des systèmes simples. Pourtant la méthode présente deux avantages au moins.*

Le premier est d'objectiver le phénomène de fibrinolyse par un graphique, ce qui libère le technicien de la surveillance directe du phénomène. Le second est de saisir, dans les cas de lyse intense, l'extrême compétition entre coagulation et fibrinolyse. Dans ces cas, en effet, le sang semble à l'œil nu rester fluide, alors que la thrombo-élastographie révèle une amorce de coagulation suivie d'une redissolution très rapide du caillot. En outre, la thrombo-élastographie paraît être la seule méthode utilisable en particulier sur l'animal.

Dès 1957, De Nicola [134] *a tenté de préciser un schéma des constantes thrombo-élastographiques de la fibrinolyse. Plus récemment,* Astrup *et coll.* [29], [160] *ont étudié les caractéristiques du tracé obtenu, par coagulation et fibrinolyse, à partir d'une*

solution pure de fibrinogène. Ces auteurs ont observé une différence dans l'allure du tracé selon qu'il s'agit d'une digestion directe du caillot par la plasmine ou bien d'une digestion consécutive à l'activation, dans le milieu, du plasminogène.

Il ne semble cependant pas, jusqu'à présent, avoir été établi une relation précise entre l'expression thrombo-élastographique de la fibrinolyse et les caractéristiques réelles de cette réaction telles qu'elles peuvent être définies par des déterminations enzymatiques précises. Il paraît sans aucun doute intéressant de comparer ces deux types de méthodes, et de déterminer s'il existe une correspondance entre la mesure thrombo-élastographique de la fibrinolyse, qui est une méthode physique, et la mesure biochimique de l'activité des mêmes enzymes.

Tel est l'objet du présent travail au cours duquel nous nous efforcerons d'analyser l'influence respective, sur le tracé thrombo-élastographique, des différents facteurs entrant en jeu au cours de la fibrinolyse (substrat, enzyme et milieu réactionnel). Nous comparerons les résultats ainsi obtenus avec ceux fournis par des méthodes biochimiques, utilisant comme substrat soit la caséine, soit la fibrine elle-même.

CHAPITRE I

BIOCHIMIE DE LA FIBRINO-FORMATION ET DE LA FIBRINOLYSE

ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION

Le sang, le plasma ou même une solution pure de fibrinogène présentent la remarquable propriété de pouvoir être solidifiés grâce à des réactions enzymatiques dites de fibrino-formation conduisant à l'apparition d'un caillot. A l'opposé, le retour à l'état liquide peut être provoqué par d'autres réactions enzymatiques, dites de fibrinolyse.

L'activité de ces enzymes joue un rôle physio-pathologique essentiel. Ces réactions se présentent soit comme des réactions de défense (coagulation extra-vasculaire, thrombolyse), soit comme des réactions pathologiques résultant d'une rupture de la balance hémostatique (thromboses, hémorragies par hypocoagulabilité ou par hyperfibrinolyse). Leur équilibre physiologique résulte de la présence dans le sang circulant de substances de nature protéique susceptibles de les activer ou de les inhiber [23], [24].

La comparaison entre ces deux types de réaction met en évidence certaines analogies qui apparaissent dans le schéma de Koller [288], [289] (*figure* 5).

Au point de vue biochimique, il est intéressant de noter que la fibrino-formation et la fibrinolyse sont des réactions enzymatiques de nature protéolytique, mais que la fibrine est dans un cas le produit de la réaction, alors qu'elle en constitue le substrat dans l'autre cas. Ceci est une des raisons de leur interférence.

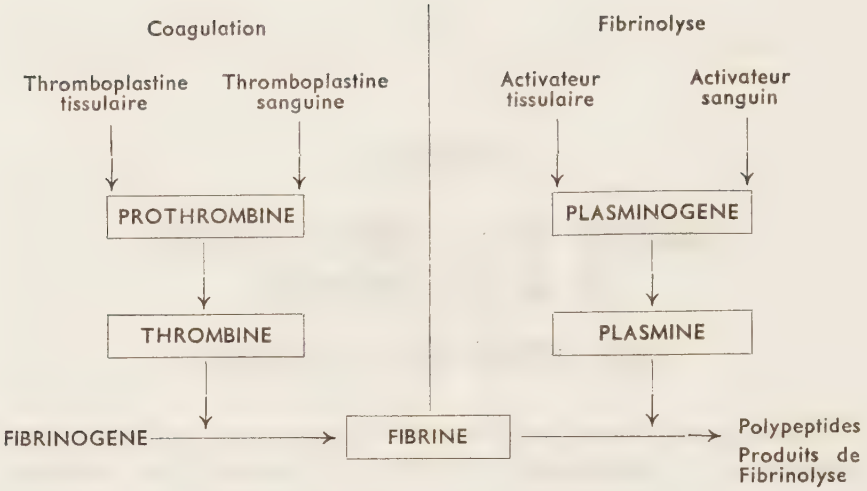


Fig. 5. — Schéma de la coagulation et de la fibrinolyse d'après Koller [289].

Parallèlement aux très nombreux travaux cliniques et biologiques [16], [470] auxquels l'étude de ces phénomènes a donné lieu, la biochimie a amplement contribué [206], [283] en particulier depuis une dizaine d'années, à une connaissance très approfondie des facteurs et du mécanisme de ces réactions. Ce sont principalement ces connaissances biochimiques que nous nous proposons de résumer dans le présent chapitre.

I. BIOCHIMIE DE LA FIBRINO-FORMATION

A. — ÉTUDE DES DIFFÉRENTS FACTEURS INTERVENANT AU COURS DE LA FIBRINO-FORMATION

La transformation du fibrinogène en fibrine est une protéolyse partielle qui nécessite la présence d'un substrat, le fibrinogène,

et d'un enzyme, la thrombine. Deux facteurs connexes jouent un rôle important dans cette réaction, le « facteur stabilisant la fibrine » et le calcium ionisé. Nous nous limiterons à l'étude de ces quatre facteurs, mais il convient de rappeler que d'autres éléments présents dans le plasma (protéines et éléments figurés) sont susceptibles d'intervenir dans cette réaction.

1. Fibrinogène ou facteur I (*).

L'existence d'un précurseur de la fibrine nommé fibrinogène par Virchow en 1847 [550] a été confirmée en 1859 par Denis de Commercy [138] et quelques années plus tard par Hammarsten [214 à 217] qui parvinrent à isoler cette protéine.

Origine.

Le rôle de la cellule hépatique dans la biosynthèse du fibrinogène avait été mis en évidence dès 1938 par Tocantins [530]. Cette biosynthèse a lieu dans les cellules parenchymateuses du foie, comme l'ont assez récemment confirmé les travaux de Barnhart et coll. [46], [191] grâce à une méthode immunologique utilisant les anti-corps fluorescents.

Distribution.

Le fibrinogène est essentiellement une protéine plasmatique ; sa concentration dans le plasma humain est de 3 à 5 g par litre(**). Il est également présent dans la lymphe et dans divers exsudats et transsudats tels que le liquide pleural et le liquide d'ascite. L'existence d'un fibrinogène plaquettaire a fait l'objet de travaux récents [257], [568] qui ont mis en évidence son rôle dans l'hémostase.

(*) Nomenclature des facteurs intervenant dans la coagulation sanguine [417].

(**) La demi-vie du fibrinogène plasmatique, déterminée à l'aide de fibrinogène marqué, est d'environ 3 jours [74], [197], [321], [334].

Propriétés physiques.

La détermination du poids moléculaire du fibrinogène a fait l'objet de très nombreux travaux. Par les méthodes de viscosité, de diffusion de la lumière, et d'ultra-centrifugation, il semble devoir être compris pour les fibrinogènes bovin et humain entre 330 000 et 340 000 [77], [97], [98], [273], [473], [497]. Des travaux plus récents indiquent cependant un poids moléculaire de 400 000 [165], [268].

Le fibrinogène serait constitué de deux subunités de poids moléculaire 170 000 environ [98], [511]. Blombaeck et coll. [77] ont constaté que le fibrinogène équin présente un poids moléculaire plus élevé que celui d'autres espèces alors que selon Caspary et Kekwick [98] il n'y a pas de différence sur ce point entre les fibrinogènes humain, bovin et ovin.

La migration électrophorétique du fibrinogène se situe entre les β_2 et les γ-globulines.

Son point iso-électrique, déterminé par électrophorèse, est de *p*H 5,5 [486], [515].

Sa structure, étudiée par différents auteurs au microscope électronique, peut être schématisée comme celle de trois subunités protéiques d'un diamètre voisin de 50 à 60 Å reliées entre elles par des chaînes de 15 Å [213]. La longueur totale de la molécule est de l'ordre de 500 à 700 Å [157], [158], [311], [473].

L'étude de biréfringence montre l'existence de chaînes peptidiques fixées sur ces subunités [243], [245] (fibrinopeptides A et B).

Hall en 1963 [212] a montré qu'au point iso-électrique la dimension de la protéine est réduite à 230 Å, alors qu'aux *p*H inférieurs et supérieurs la dimension est normale.

Les constantes de sédimentation [72], [98], [165], [268], [439], [473], de viscosité [268], [473] ainsi que de volume partiel spécifique [268], [473] du fibrinogène d'origine humaine ou bovine sont très voisines, comme l'indique le tableau suivant :

TABLEAU I

Tableau récapitulatif des principales constantes physiques des fibrinogènes humains et bovins

Constantes	Fibrinogène	
	humain	bovin
Sédimentation $S_{20,w}$	7,6-8,5	7,6-8,5
Viscosité intrinsèque, g/100 ml	0,25	0,24-0,25
Volume partiel spécifique, ml/g	0,71-0,72	0,71-0,72

L'étude polarimétrique dans l'ultra-violet lointain a été réalisée récemment par Capet-Antonini [94] qui, étudiant la structure hélicoïdale du fibrinogène, estime le pourcentage d'hélice - α à 38 pour 100. Cohen a émis l'hypothèse que les parties hélices - α du fibrinogène ou du monomère de fibrine sont localisées au niveau des connexions entre les trois sous-unités de la molécule [117].

Composition et propriétés chimiques.

Le fibrinogène constitue une des protéines les moins solubles du plasma. Il précipite en milieu salin (chlorure de sodium à demi-saturation, sulfate d'ammonium au quart de saturation) [108]. Il est le constituant principal de la fraction I de Cohn (50 à 70 pour 100) [17], [118] ainsi que de la fraction F de Kekwick [17], [277], [278].

La composition du fibrinogène est celle d'une glycoprotéine ; le fibrinogène humain libère par hydrolyse 5 pour 100 d'oses alors que le fibrinogène bovin n'en libère que 2,3 pour 100 [567]. Cette partie glucidique contient des hexoses, de la glucosamine et de l'acide neuraminique. La teneur en hexoses (D-mannose et D-galactose) du fibrinogène de différentes espèces varie selon

les auteurs entre 1,0 pour 100 et 4,6 pour 100 [81], [120], [256], [307], [386], [488], [520], [521], [567]. La teneur en glucosamine est comprise entre 0,5 et 1 pour 100 [81], [120], [520], [521], [567] et le taux d'acide sialique de l'ordre de 0,8 pour 100 [81], [82], [567]. La partie glucidique du fibrinogène bovin contient de l'acide sialique comme groupe terminal, du D-galactose lié en 1,6 ou en position terminale, du D-mannose en liaison 1,3 et de la D-glucosamine en position 1,4 ou 1,3 [379]. Cette partie glucidique semblerait liée à la protéine par une liaison entre la glucosamine se trouvant à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide et un groupe amide de l'acide aspartique. Il en résulte une liaison N-acétyl-D-glucosaminyl-3-aspartylamide [382]. La partie protéique est de constitution très voisine pour les fibrinogènes humain et bovin [250], [388]. Leur composition en acides aminés [39], [86], [276], [388], [536] a été établie par différents auteurs comme l'indique le *tableau* II.

Les acides aminés terminaux ont été déterminés par Lorand et Middlebrook (1952) [353] et Bailey et Bettelheim (1955) [40] par la méthode au dinitrophényl (DNP) de Sanger, Blombaeck et Yamashina (1958) [80] utilisèrent la méthode d'Edman au phénylthiocarbamyl. Ils montrèrent que le fibrinogène de sept espèces différentes contient 0,4 à 0,6 mole de tyrosine N-terminale par 10^5 g de protéine. Un second acide aminé N-terminal a été découvert : alanine dans le cas du fibrinogène humain et thréonine dans le cas des fibrinogènes de chien et de cheval. Le troisième acide aminé N-terminal est apparemment masqué dans les fibrinogènes humain, bovin, canin et équin. Cet acide aminé est la glycine dans le cas des ovins.

Le fibrinogène possède selon certains auteurs [36], [95], [250], [341] moins d'un groupe sulfhydryl détectable par molécule. Selon Henschen [250] il y aurait dans la molécule des fibrinogènes humain et bovin 28 à 29 ponts disulfures dont la réactivité au sulfite dépend de la position dans la molécule [100]. L'action des sulfites se traduit par un clivage de la molécule en six sous-unités de même taille et de poids moléculaire de 50 000 à 65 000

[244], [249], [268]. A ce propos, la possibilité d'une structure dimère du fibrinogène est encore discutée [72], [98], [243], [245], [268].

TABLEAU II

Composition en acides aminés des fibrinogènes humain et bovin

(en grammes pour 100 de poids sec)

Acides aminés	Fibrigonène		
	humain	bovin	bovin
	Composition d'après		
	Tristram [536], [537]	Mihalyi [388]	Keil [276]
Glycine	5,6	6,24	(*)
Alanine	3,7	3,26	4
Valine	4,1	5,17	5
Leucine	7,1	6,51	9
Isoleucine	4,8	4,79	
Sérine	7,0	7,06	(*)
Thréonine	6,1	6,78	6
Cystéine	0,4	2,59	3
Cystine	2,3 (2,7)		
Méthionine	2,6	2,21	(*)
Phénylalanine	4,6	4,32	7
Tyrosine	5,5	5,30	–
Tryptophane	3,3	4,88	–
Proline	5,7	5,30	5
Ac. aspartique	13,1	13,74	13
Ac. glutamique	14,5	13,68	17
Lysine	9,2	9,28	8
Arginine	7,8	8,23	8
Histidine	2,6	2,57	4
Total pour 100	110	111,91	105

(*) La somme de sérine, glycine et méthionine représente 16 pour 100.

L'oxydation de la molécule de fibrinogène [313] ou son acétylation [96] modifie son aptitude à coaguler en présence de thrombine.

En dehors de la thrombine, d'autres enzymes protéolytiques : papaïne [156], [468], [514], ficine [156], [468], [514], reptilase [73], [254] et même des agents chimiques (chloramine T, alloxane) sont susceptibles de provoquer la coagulation du fibrinogène. La trypsine, quant à elle, accélère la coagulation du sang total principalement par transformation de la prothrombine en thrombine [155], [156] mais retarde la coagulation du fibrinogène par la thrombine par attaque de certaines liaisons du fibrinogène le rendant coagulable plus lentement [7], [44], [332].

Méthodes de préparation et dosage.

Le fibrinogène est préparé par séparation à partir du plasma. Nous avons rassemblé dans un tableau récapitulatif (*tableau* III) les principales méthodes de préparation du fibrinogène qui sont toutes des méthodes par précipitation.

Le procédé le plus souvent utilisé est celui de Cohn [118] qui conduit à une fraction I [17], [93], [404] contenant outre le fibrinogène, du plasminogène, le facteur antihémophilique A, une cryoglobuline et un enzyme (fibrinase) désigné sous le nom de fibrin stabilizing factor (FSF ou encore de Lorand Laki factor (LLF).

La purification des préparations brutes de fibrinogène a fait l'objet de nombreux travaux résumés dans le *tableau* XXIX (chapitre II).

Différentes méthodes de dosage du fibrinogène ont été proposées comme l'indique le tableau IV.

2. Thrombine.

Découverte en 1872 par Schmidt [475], la thrombine est un enzyme qui ne préexiste pas dans le plasma et se forme au

TABLEAU III

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES PRINCIPALES MÉTHODES DE PRÉPARATION DU FIBRINOGÈNE PAR PRÉCIPITATION

Méthodes	Techniques	Auteurs
Cryopréparation	Froid	WARE et coll. (1947) [564]. JOHNSON et SEEGERS (1955) [267].
Précipitation par sels minéraux	Chlorure de sodium	Denis de COMMERCY (1859) [138]. FLORKIN (1930) [187].
	Sulfate d'ammonium	SMITH et coll. (1937) [504]. LAKI (1942) [305]. NEURATH et coll. (1943) [418]. LOEWY et coll. (1961) [339].
	Tampon phosphate	JACQUES (1943) [261].
Précipitation par solvant organique	Chloroforme	FREDERICQ (1942) [192]. MINOT (1915) [395]. NOLF (1938) [427]. SCHEURING (1937) [474].
	Ethanol	COHN et coll. (1946) [118]. MORRISSON et coll. (1948) [401].
	Ether	KEKWICK et MACKAY (1954) [277].
Précipitation par sels minéraux et solvant organique	Sulfate d'ammonium Tampon phosphate Ethanol	CAPET-ANTONINI (1966) [93].
Précipitation par solvant organique en présence d'amino-acide	Ethanol, glycine	BLOMBAECK et BLOMBAECK (1956) [69].
Précipitation par amino-acide	Glycine β-alanine	KAZAL et coll. (1963) [275]. STRAUGHN et WAGNER (1966) [517].
Précipitation par complexe métallique de métaux lourds	Mercurithiocyanate de potassium	BROWN et ROTHSTEIN (1967) [88].

TABLEAU IV

Tableau récapitulatif des principales méthodes de dosage biochimique du fibrinogène

Méthodes	Techniques	Auteurs
Méthodes non spécifiques	Dosages classiques des protéines	
Méthodes spécifiques : • Détermination de l'azote total (selon Kjeldahl)	Technique de dosage différentiel entre l'azote total du plasma et celui du sérum	Peters et Van Slyke (1942) [446].
• Thermocoagulation du fibrinogène à 55-56° en présence : *a*) de NaCl et $CaCl_2$ *b*) de thrombine calcique	– méthode pondérale – méthode pondérale – colorimétrie au biuret	Sassier (1936) [335]. Leroux et coll. (1952) [331]. Ardry (1960) [18].
• Relargage par des sels minéraux (sulfate d'ammonium)	– colorimétrie au biuret – opacimétrie	Marenzi et Gomez (1951) [370]. Parfentjev et coll. (1953) [445]. Vincent et coll. (1962) [549].
• Transformation du fibrinogène en fibrine	voir *tableau* XXXII, chapitre II.	

moment de la coagulation à partir d'un précurseur plasmatique : la prothrombine [390 à 392] dont la biosynthèse est réalisée par les cellules hépatiques. L'action coagulante de la thrombine sur le fibrinogène se traduit par une protéolyse limitée.

Propriétés physiques.

La thrombine est une protéine de poids moléculaire compris entre 30 000 et 35 000 [5], [47], [218], [315], [481], [483], [519], [566]. Les thrombines d'origine humaine et bovine ont un poids moléculaire très voisin [5], [47], [315], [566]. La dimension de cette protéine est de 92 Å [459]. Les principales constantes physiques de la thrombine sont résumées dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU V

PRINCIPALES CONSTANTES PHYSIQUES DE LA THROMBINE D'APRÈS HARMISON ET COLL. [218].

Constantes	
Sédimentation $S_{20,w}$ (unités Svedberg)	3,76
Diffusion, $cm^2/sec.$	$8,76 \cdot 10^{-7}$
Viscosité intrinsèque, g/100 ml	0,0376
Volume partiel spécifique, ml/g	0,69

Le point iso-électrique est de 5,3 ou de 5,7 selon la force ionique du milieu [482].

Propriétés chimiques et enzymatiques.

La thrombine est une protéine soluble dans l'eau et précipite par le sulfate d'ammonium à 45 pour 100 de saturation. C'est

une hydrolase présentant une activité protéasique et estérasique [494].

L'activité protéolytique de la thrombine [209], [297], [426] se manifeste sur le fibrinogène par la transformation de cette protéine en fibrine [317], [376], [378], [412], [413]. La thrombine agit en rompant les liaisons arginine-glycine du fibrinogène [199] et en libérant ainsi des peptides [41] porteurs d'acide glutamique en position N-terminale [42], [57], [353]. L'activité protéolytique de la thrombine se manifeste sur différentes autres protéines : la caséine [479], la β-lactoglobuline [444], la gélatine [389], l'albumine [526], l'insuline [162], la sécrétine [415]. Elle présenterait même une action protéolytique sur la fibrine [209]. Elle aurait en outre la propriété d'activer certains zymogènes tels que le trypsinogène, le plasminogène et le chymotrypsinogène A [166], [167].

La thrombine présente une activité estérasique mise en évidence en 1954 par Sherry et coll. [494]. Cette activité estérasique est généralement déterminée sur des substrats synthétiques parmi lesquels le TAME (p. toluène sulfonyl-l-arginine méthylester) [164], [316], [355], [362], [465], le BAME (benzoyl-arginine méthylester) [495], le BAEE (benzoyl-arginine-éthylester) et le TLME (tosyllysineméthylester) [124], [164], [362].

La thrombine est considérée comme une protéase dont l'activité estérasique est voisine de celle de la trypsine, en raison de son action sur les esters d'amino-acides :

— Esters de la l-lysine (dont la fonction aminée doit être bloquée) [124], [163] ;

— Esters de l'arginine [124], [164], [316], [355], [362], [465] et les liaisons amides :

— β-naphtylamides [287],
— Acylarginylamides [332],
— Peptidylarginylamides [310],
— Benzoylarginyl p. nitro-anilide [454].

Cette analogie avec la trypsine se retrouve également dans l'action de la thrombine sur les p. nitrophénylesters [348], [372] et dans son action sur le fibrinogène où l'enzyme hydrolyse certaines liaisons arginine-glycine.

La comparaison des constantes de Michaelis des réactions de la thrombine sur le fibrinogène et sur le TAME [480] a conduit Blombaeck à en déduire que l'affinité de la thrombine pour la liaison du peptide A est supérieure à celle de la thrombine vis-à-vis de la liaison ester [68].

Les activités coagulante, protéolytique et estérasique de la thrombine sont inhibées par le DFP (di-isopropyl-fluorophosphate) [40], [41], [199], [393]. Cette réaction d'inhibition laisse à penser que le site actif de la thrombine, comme celui de la trypsine et de la chymotrypsine, serait en partie formé d'un résidu sérine [471]. Compte tenu de ces données, Lorand a émis l'hypothèse selon laquelle l'action de la thrombine sur le fibrinogène comporterait une réaction d'acylation intermédiaire entre le substrat et la sérine du site actif de l'enzyme [347].

Formation de la thrombine.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la thrombine ne préexiste pas dans le plasma et se forme par l'activation de la prothrombine grâce à un activateur spécifique nommé prothrombinase, capable d'hydrolyser la prothrombine en présence de calcium ionisé. Cette réaction est accélérée par certains produits plasmatiques (convertine : facteur VII, accélérine : facteur V). La purification de la thrombine a été étudiée par de nombreux auteurs [145], [291], [452], [487].

3. Facteur stabilisant la fibrine ou facteur XIII (*)

En dehors du fibrinogène et de la thrombine intervient dans la fibrino-formation un troisième facteur appelé FSF qui, en

(*) FSF [46] ou facteur XIII ou LLF [312] ou fibrinase [339], présent dans la fraction V de Cohn et la fraction P de Kekwick.

présence de calcium ionisé, rend irréversible la polymérisation de la fibrine. Il s'agit d'un enzyme, également appelé fibrinase, découvert par Robbins en 1944 [460]. Cette protéine présente une constante de sédimentation [338] et un poids moléculaire (350 000) [338] très voisins de ceux du fibrinogène [213]. Sa structure au microscope électronique est en outre proche de celle du fibrinogène parce qu'elle comporte 3 sous-unités sphériques [338] de poids moléculaire environ 110 000.

Le FSF est considéré comme une transamidase [336], [337], [352] catalysant dans la molécule de fibrine le remplacement d'un groupement aminé sur le β-carboxyl de l'asparagine par la glycine N-terminale d'une autre molécule de fibrine [107], [311]. En présence de FSF et de calcium, la fibrine formée est insoluble dans l'urée 5 M [312], [340], [344], [345], [462]. Le FSF est présent dans les préparations de fibrinogène humain et bovin (fraction I de Cohn). Il peut en être séparé par différentes méthodes [339], [349], [359]. Buluk [90] et Lorand [351] ont montré que l'activation du FSF n'était pas seulement due à la présence de calcium ionisé mais aussi à celle de la thrombine.

4. Rôle du calcium, du *p*H et de la température.

Le *calcium* à l'état ionisé (Ca^{++}) accélère la transformation du fibrinogène en fibrine [487] et permet, avec la thrombine, l'activation du FSF [312].

Le rôle du *p*H dans l'étude de la coagulation du fibrinogène par la thrombine a été mis en évidence par Seegers et Smith [487], qui estimèrent le *p*H optimum de coagulation compris entre 7,5 et 8,6. Pour Michaelis [in 199] l'optimum serait *p*H 8.

La *température* joue un rôle important dans la fibrino-formation. L'activité coagulante de la thrombine augmente avec la chaleur jusqu'à 50 °C, température à partir de laquelle l'enzyme est dénaturé [487].

B. Mécanismes de la réaction de transformation du fibrinogène en fibrine.

Depuis 1945 [314] les auteurs s'accordent pour considérer que la fibrino-formation est une protéolyse partielle suivie d'une polymérisation de la molécule. La réaction de transformation du fibrinogène en fibrine peut être schématisée de la façon suivante :

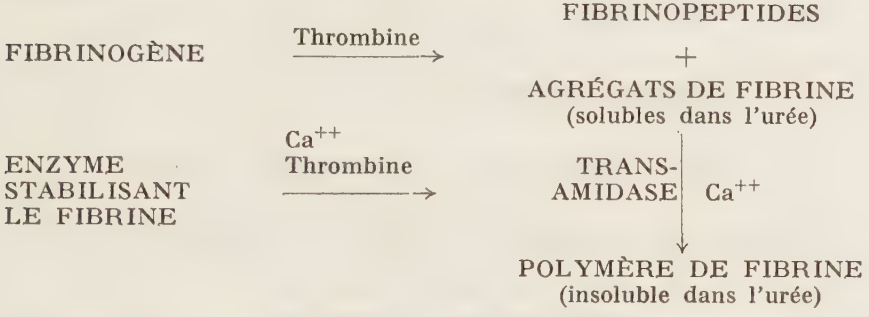


Fig. 6. — Schéma de la réaction de transformation du fibrinogène en fibrine.

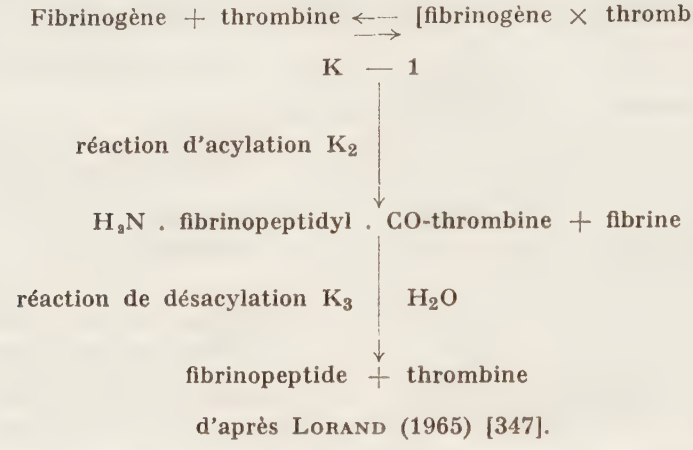
Seegers, W.H., *ed* Blood Clotting Enzymology. New York et London. *Academic Press Inc.*, 1967, p. 13.

La cinétique de la réaction enzymatique globale de fibrino-formation [19], [398], [443] varie avec la composition du milieu. A température constante, la réaction obéit à la relation de Quick, $t = k\,c$, où t représente le temps de coagulation, c la concentration en thrombine, k un coefficient qui demeure stable mais qui est fonction de la force ionique du milieu, du *p*H et de l'intervention de facteurs biologiques annexes (activateurs ou inhibiteurs) de la thrombine à ce stade [68].

La réaction de fibrino-formation était composée selon certains auteurs [93] de trois étapes. Le schéma de Seegers met bien en évidence deux temps de réaction seulement (apparition du monomère de fibrine et polymérisation). L'action du FSF [93] intervient (polymérisation du monomère de fibrine) en rendant irréversible la formation de fibrine.

1. Formation de monomères de fibrine avec libération de fibrinopeptides.

La première étape de la fibrino-formation résulte de l'action protéolytique de la thrombine sur le fibrinogène [40], [339], [384], elle-même schématisée de la façon suivante :



d'après Lorand (1965) [347].

Fig. 7. — Schéma de la réaction de formation de monomères de fibrine avec libération de fibrinopeptides.

La formation de la fibrine donne naissance aux monomères de fibrine et à deux substances peptidiques résiduelles appelées fibrinopeptide par Lorand [346], mixture de peptide ou cofibrine par Laki [308] ou fibrinopeptides A et B de Bailey et Bettelheim [40].

Ménaché a donné une représentation schématique des modifications subies par le fibrinogène sous l'action de la thrombine [377].

a) Formation des fibrinopeptides.

Lorand isola le premier fibrinopeptide bovin en 1952 [346] puis Bailey et Bettelheim caractérisèrent les fibrinopeptides A et B [57], [57]. Les deux peptides ont un poids moléculaire

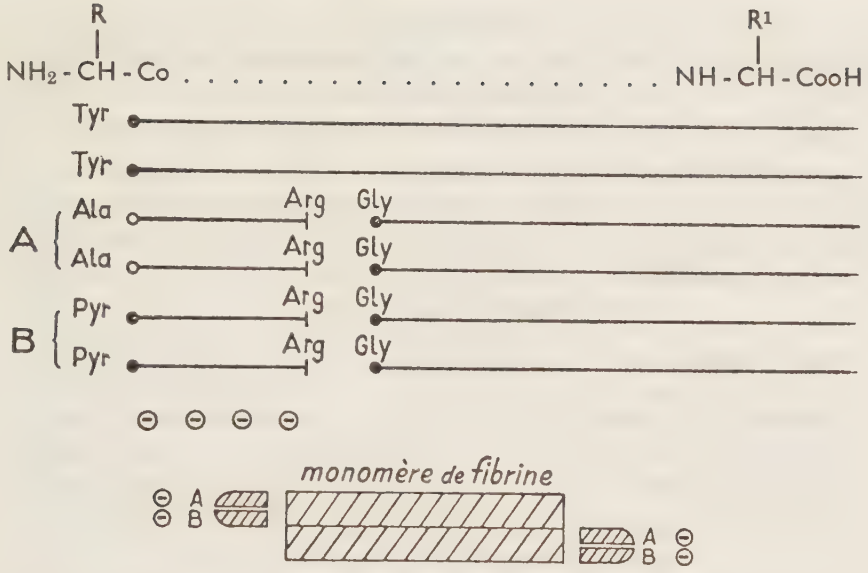


Fig. 8. — Schéma des modifications subies par le fibrinogène sous l'action de la thrombine.

très voisin de l'ordre de 2 000-2 400 [198] et comportent respectivement selon l'espèce de 13 à 19 acides aminés pour le fibrinopeptide A et de 9 à 21 pour le fibrinopeptide B [70], [71], [75], [77], [148], [149], 189], [190], [439], [440], [503].

En 1966, Blombaeck et coll. ont isolé quatre fibrinopeptides (A, AP, Y et B) à partir du fibrinogène humain [70]. Les fibrinopeptides AP (fibrinopeptide A phosphorylé) et Y (fibrinopeptide A moins l'alanine en position N-terminale) résulteraient de la dégradation du fibrinogène ou du fibrinopeptide A in vivo ou in vitro, ou bien, autre hypothèse, correspondraient à plusieurs types de fibrinogène. Quoi qu'il en soit, Blombaeck et Gröndahl très récemment confirmèrent, par l'analyse du fibrinogène chez cent individus, la présence des 4 fibrinopeptides [76].

Différentes méthodes d'isolement des fibrinopeptides, résumées dans le *tableau* VI, ont permis l'analyse de la composition en acides aminés des deux fibrinopeptides [56], [70], [79], [198], [346].

TABLEAU VI

Tableau des principales méthodes d'isolement des fibrinopeptides

Méthodes	Techniques	Auteurs
Précipitation par solvants organiques	Précipitation par acide trichloracétique et acétone 75° v/v	Lorand (1952) [346].
Electrophorèse sur papier et chromatographie sur colonne	Chromatographie sur gel	Bettelheim [1956) [56].
Chromatographie sur colonne	Chromatographie sur résine échangeuse d'ions (Dowex 50 × 2)	Blombaeck, Vestermark (1958) [79].
Précipitation par solvants organiques et chromatographie sur colonne	Précipitation par acide trichloracétique, acétone, alcool, éther. Chromatographie sur DEAE-cellulose	Gladner et coll. (1959) [198].
Concentration par évaporation et chromatographie sur colonne	Chromatographie double sur résine échangeuse d'ions (Dowex 50 × 2)	Blombaeck et coll. (1966) [70].
	Chromatographie double sur Séphadex (G 10 ou G 25) et sur résine échangeuse d'ions (Dowex 50 × 2)	Blombaeck et coll. (1966) [70].

Le fibrinopeptide A issu du fibrinogène bovin contient l'acide glutamique qui était situé en position N-terminale dans la molécule du fibrinogène. Dans le cas du fibrinogène humain, l'acide aminé N-terminal du fibrinopeptide A est l'alanine.

Le fibrinopeptide B ne contient pas de résidu N-terminal décelable. Sa présence explique que le nombre des groupes terminaux de glycine dans la fibrine est plus grand que le nombre des groupes terminaux d'acide glutamique dans le fibrinogène.

L'analyse de ces fibrinopeptides a été conduite après coagulation du fibrinogène par la thrombine homologue ou une thrombine hétérologue. La composition et les propriétés des fibrinopeptides isolés ne paraissent pas avoir été influencées par la nature de la thrombine utilisée [149,] [441].

Bettelheim en 1956 [56] étudia la vitesse d'apparition des fibrinopeptides A et B à partir du fibriogène [491], [492]. Il a établi que, en solution pure, lorsque 40 pour 100 de petide A sont libérés, cela suffit à provoquer la gélification de la fibrine [1], [524] ; la quantité de petide B formé n'est alors que de 0 à 8 pour 100 [1], [79]. Dans le plasma, 6 pour 100 seulement de peptide A se trouvent formés lorsque la gélification commence [1], [524].

b) *Formation du monomère de la fibrine.*

Le monomère de la fibrine a été défini comme étant identique à la molécule de fibrinogène amputée de ses fibrinopeptides. La réversibilité de l'équilibre a été démontrée par Laskowski et coll. (1952) [319] :

Fibrinogène ⟶ monomères de fibrine
+ thrombine ⟵ + fibrinopeptides A et B

Fig. 9. — Schéma de la réaction de formation du monomère de la fibrine.

Les travaux de Laki et coll. de 1945 à 1953 mettent en évidence la protéolyse du fibrinogène par la thrombine même à bas *p*H (5,3) où la coagulation n'était pas visible [306], [309], [314]. Ces travaux ont été confirmés par Laskowski et coll. en 1956 [318] et Bailey et Bettelheim en 1955 [40], [41]. Dans ces conditions, Ehrenpreis et coll. ont montré qu'il existait une relation du premier ordre entre la formation du monomère de fibrine et la concentration en fibrinogène [161]. De nombreux travaux ont été entrepris depuis 1951 pour déterminer les acides aminés en position N-terminale du fibrinogène

TABLEAUX DES ACIDES AMINÉS EN POSITION N-TERMINALE DU FIBRINOGÈNE ET DE LA FIBRINE

TABLEAU VII

FIBRINOGÈNE ET FIBRINE BOVINS (*) (**).

Auteurs	Fibrinogène			Fibrine		
	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Glu	Gly
LORAND et MIDDLEBROOK (1952) [353]	1,5	0,7	—	1,4-1,6	—	3,0-3,7
BAILEY et BETTELHEIM (1955) [40], [41]	2,3	1,3	—	2,3	—	2,7
BLOMBAECK et YAMASHINA (1958) [80].	1,9	1,7	—	1,9	—	3,9
VON KORFF et coll. (1963) [561].	1,9	1,6	—			

TABLEAU VIII

FIBRINOGÈNE ET FIBRINE HUMAINS (*) (**).

Auteurs	Fibrinogène				Fibrine			
	Tyr	Ala	Asp	Gly	Tyr	Ala	Asp	Gly
LORAND et MIDDLEBROOK (1953) [354].	1,6	1,1	—	—	1,6	—	—	2,8
BLOMBAECK et YAMASHINA (1958) [80].	1,7	1,3	—	—	1,7	—	—	3,2
VON KORFF et coll. (1963) [561].	1,9	1,6	0,9	—				
BLOMBAECK et coll. (1966) [70].	2,1	1,4	0,4	—	2,4	—	—	4,4
ABILGAARD (1965) [1].	2,0	2,0	0,3	—	2,1	0,2	—	4,0

(*) La quantité d'acides aminés est exprimée en mole par molécule de fibrinogène ou de fibrine.

(**) Le poids moléculaire choisi pour le fibrinogène comme pour la fibrine est de 340 000.

de différentes espèces et de la fibrine correspondante formée [1], [40], [41], [70], [80], [353], [354], [561] comme l'indiquent les *tableaux* VII *et* VIII.

Tandis que la molécule de fibrinogène humain est caractérisée par des extrémités N-terminales qui sont la tyrosine et l'acide glutamique, celles du monomère de la fibrine conservent la tyrosine mais perdent l'acide glutamique au profit de la glycine.

De même les extrémités N-terminales du fibrinogène bovin tyrosine, alanine et acide aspartique, deviennent dans le monomère de fibrine, tyrosine et glycine.

Comme nous l'avons déjà souligné, la thrombine rompt les liaisons arginine-glycine et la glycine apparaît en position N-terminale dans la fibrine lorsque les fibrinopeptides ont été libérés.

Les composés glucidiques de la fibrine présentent les mêmes types de liaison que ceux du fibrinogène [379]. Il y a, de même, identité entre les trois fibrinoglycopeptides isolés à partir du fibrinogène et de la fibrine, par dégradation par la pronase [381]. De nombreux auteurs [38], [67], [307], [520] ont pensé qu'à la protéolyse partielle du fibrinogène par la thrombine était associée une libération d'hexoses. Depuis les travaux de Mester, il semble que cette conclusion soit fausse [256], [383].

De plus, comme il a été dit à propos des fibrinopeptides, l'utilisation de la thrombine bovine ou de la thrombine humaine ne semble pas influencer le type de fibrine formée [149], [441].

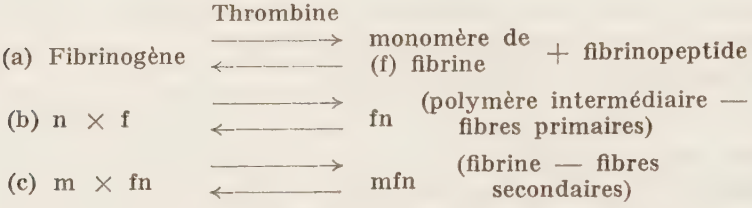
2. **Polymérisation des monomères de fibrine, polymères intermédiaires et polymères irréversibles.**

Après formation des monomères de fibrine, il se produit une polymérisation [494] selon le schéma placé à la page suivante.

La réversibilité de l'équilibre (b) a été démontrée par Scheraga et coll. [473] et Ferry et coll. (1952) [178] puis enfin Donnelly et coll. [147]. Ce dernier auteur a mis en évidence la réversibilité de l'équilibre (c) par dissolution de la fibrine dans NaBr M

à différents *p*H. A *p*H 5,3, il y a formation de monomères, à *p*H 6 de monomères et de polymères intermédiaires (fn). Le retour à *p*H 5,3 rend réversible la réaction.

L'étape (c) est rendue irréversible en présence de FSF. Une fibrine insoluble (fibrine « I ») dans l'urée 5 M est alors obtenue [340]. En absence de FSF, la fibrine, soluble dans l'urée 5 M, est dite fibrine « S » [312].



d'après Donnelly et coll. (1955) [147].

Fig. 10. — Schéma de la réaction de polymérisation des monomères de fibrine.

La longueur des polymères intermédiaires a été évaluée à 3 000-4 000 Å par des mesures de biréfringence ou de diffusion de la lumière [178]. Le poids moléculaire, calculé approximativement de 5 millions, correspond à une agrégation de 15 monomères de fibrine en un polymère intermédiaire. La formation de ce composé intermédiaire a été étudiée par Haschemayer en 1963 [243]. Lorsqu'un peptide A de la molécule est libéré par action de la thrombine ou de la reptilase sur le fibrinogène, un moment dipolaire longitudinal apparaît. Lors du détachement du deuxième peptide A, le moment dipolaire longitudinal devient transversal [243]. Les monomères de fibrine s'associent dans le sens de la largeur (polymérisation transversale) pour former des polymères intermédiaires (fibres primaires) [178]. Mais le départ des charges terminales fait perdre aux extrémités des monomères de fibrine leur caractère électro-négatif qui les protégeait de l'agrégation par répulsion électrostatique [307], hypothèse confirmée par les travaux de De Roberties au microscope électronique [140]. Il en résulte une tendance à la polymérisation longitudinale pour former un gel insoluble (Lorand, 1965) [347].

II. — BIOCHIMIE DE LA FIBRINOLYSE

Le terme de fibrinolyse, créé par Dastre [125] en 1893, désigne une réaction enzymatique de protéolyse de la fibrine [358] par un enzyme actif appelé plasmine ou fibrinolysine, isolé par Seegers et Loomis en 1946 [485]. Cette fibrinolyse peut se produire spontanément dans le sang après activation d'un zymogène normalement présent, étudié par Christensen [109], [113] et Kaplan [270], activation dont le mécanisme diffère de celui du système trypsinogène-trypsine [271], [405], [464], [539], bien que l'activation du plasminogène par la trypsine soit identique à celle due à la plasmine [9].

A. — ÉTUDE DES DIFFÉRENTS FACTEURS INTERVENANT DANS LA FIBRINOLYSE

1. Fibrine.

La fibrine est le substrat de la réaction résultant de la transformation par voie enzymatique du fibrinogène. Le caractère essentiel de ce substrat est son insolubilité. A ce propos, il est intéressant de noter que lorsque la fibrine est formée en l'absence d'une protéase désignée sous le terme de « facteur stabilisant la fibrine », elle est soluble dans une solution neutre d'urée 5 M et dans une solution d'acide monochloracétique à 1 pour 100 tandis qu'en présence de ce facteur et de calcium ionisé, elle est insoluble dans la solution 5 M d'urée et dans la solution d'acide monochloracétique à 1 pour 100.

Nous avons longuement exposé dans la première partie de ce chapitre la réaction de fibrino-formation ainsi que les connaissances actuelles sur la structure du caillot de fibrine.

Notons que la pureté de la fibrine dépend de celle du fibrinogène et que, pour des produits courants d'origine commerciale, cette fibrine contient des quantités non négligeables de plasminogène [93]. Astrup a montré que, le chauffage pendant 45 minutes à 80° C [469] provoque, en atmosphère humide, une inacti-

vation du zymogène et permet ainsi d'éviter la lyse spontanée du caillot de fibrine en présence d'activateur [30].

De nombreux auteurs ont proposé des méthodes de purification du fibrinogène en vue de l'étude de la lyse après transformation en fibrine. Ces méthodes portent sur l'élimination du plasminogène (*tableau* XXIX) et l'élimination du FSF [94], [502], [540], protéines contaminant le fibrinogène. Il est à noter que le substrat de lyse étant la fibrine, ALLINGTON [13] a tout dernièrement proposé une méthode extrêmement intéressante de purification non du fibrinogène mais du monomère de fibrine, recherche orientée par les observations au microscope électronique de KAY et CUDDIGAN [247] qui donnèrent à penser que la solution de monomère de fibrine contenait moins de protéines contaminantes que la solution de fibrinogène initiale.

2. **Plasmine** (*).

On désigne sous le terme de plasmine une protéase [272], [493], [554] susceptible d'agir sur une grande variété de substrats. Cet enzyme est présent dans le plasma et dans différents tissus sous forme d'un précurseur qui est son zymogène.

Origine et localisation.

La génération de la plasmine par activation du plasminogène est un processus physiologique [185] presque négligeable dans le plasma de sujets normaux et qui peut atteindre une forte intensité à l'état pathologique.

Propriétés physiques.

Le poids moléculaire de la plasmine, tout d'abord estimé à 108 000-127 000 [128], [499], [500], [546], semble varier selon l'activateur utilisé pour transformer le plasminogène [500], [546] et serait, pour une plasmine hautement purifiée, selon KLINE [283], de 89 000.

(*) Commercialisée sous différents noms : Fibrinolysine, Lysofibrine.

La plasmine a été identifiée comme étant une β_1-globuline [461] non dialysable et thermolabile.

La constante de sédimentation de cette protéine très purifiée – 140 unités caséinolytiques Remmert et Cohen par mg d'azote – par chromatographie sur DEAE Séphadex, a été estimée à 4,4 unités Svedberg [461].

Le *p*H optimum d'activité protéolytique de la plasmine se situe entre 7,5 et 8,3 [408].

La plasmine est très instable en solution aqueuse, même à très basse température [408]. Ses solutions peuvent être stabilisées par addition de glycine 0,2 N [430], de chloroforme [408], de glycérol à 50 pour 100 [8], [285], [490], de caséine [282], [408] ou d'acides aminés basiques estérifiés [282], [408].

Propriétés chimiques.

La plasmine est une glycoprotéine contenant 14,1 pour 100 d'azote et 1,5 pour 100 d'hexoses [500]. Le rapport tyrosine/tryptophane, qui est pour cette molécule de 1/1,56, est identique à celui du plasminogène [428], [500].

Propriétés enzymatiques.

Les activités enzymatiques de la plasmine sont de deux ordres : protéolytique et estérasique [477], [478].

Le site actif de cet enzyme, étudié par Ronwin en 1960, rappelle celui de la trypsine et comprendrait principalement une séquence acide aspartique-sérine-glycine [466], [467].

Activité protéolytique.

Cette activité protéolytique peut être mise en évidence sur une grande variété de substrats :

Protéines plasmatiques :

— Fibrinogène et fibrine [272], [493], [554] ;

— Facteurs lipoprotéiques labiles de la coagulation (facteurs V pro-accélérine et VIII globuline anti-hémophilique A) [6], [121] ;

— Complément [6] ;

— Hémoglobine [6] ;
— γ-globulines [489] ;
— Bradykinine.

Protéines diverses :

— Caséine [3], [20], [109], β-lactoglobuline [112] ;
— Gélatine [109], [110] ;
— Hormones protéiques : hormone adrénocorticotrope hypophysaire [396], hormone somatotrope hypophysaire [396], glucagon [396] ;
— Protamine [280] ;
— Cartilage [296].

L'action de la plasmine sur le fibrinogène et la fibrine a été très étudiée [272], [493], [554]. Il a été montré que la fibrinogénolyse par la plasmine résulte d'une action de l'enzyme sur des sites différents de ceux impliqués dans l'activité de la thrombine ou de la trypsine.

La détermination de cette activité protéolytique se fait par des méthodes utilisant le plus souvent la caséine ou la fibrine (à des concentrations variant entre 1 et 4 pour 100) (*voir tableau* IX).

Activité estérasique.

Son action estérasique s'exerce sur certains esters de la lysine et de l'arginine [478], [539] :

TAME (p. tosyl l-arginine méthylester) ;
BAME (benzoylarginine méthylester) ;
LME (lysine méthylester) ;
LEE (lysine éthylester) ;

La plasmine hydrolyse ainsi les p. nitrophénylesters [372] et le BAPA (benzoyl dl-arginine p. nitro-anilide) [454]. Ces propriétés sont également utilisées pour son dosage, ce qui conduit à la définition d'unités estérasiques correspondant au nombre de micromoles de substrat hydrolysé par minute.

Modes d'obtention et de purification de la plasmine.

La plasmine est préparée par activation de son zymogène [360], [411], [430], [463], [554]. L'enzyme actif obtenu peut être purifié par chromatographie utilisant le Séphadex et le DEAE-Séphadex [461].

3. **Plasminogène.**

Le plasminogène est une β_2-glycoprotéine [251], [461] susceptible d'être activée en plasmine en présence de certains solvants organiques et de substances d'origine bactérienne ou animale.

TABLEAU IX

Tableau des principales unités (*) caséinolytiques et fibrinolytiques

Substrats	Définition de l'unité	Auteurs
Caséine (mesure de la quantité de tyrosine libérée par protéolyse	150 µg tyrosine/min.	Kunitz (1947) [229].
	1/1 000 unité Kunitz	Mullertz (1955) [408] Norman (1957) [428]. Hagan et coll. (1960) [211].
	450 µg tyrosine/min.	Remmert et Cohen (1949) [457].
	180 µg tyrosine/60 min.	Alkjaersig et coll. (1959) [10].
Fibrine (mesure de la quantité de substrat protéolysée)	1,1mg de fibrine protéolysée/min.	Loomis et coll. (1947) [343].
	1/30 unité Loomis	Christensen (1949) [111].
	1/20 unité Loomis	Alkjaersig et coll. (1958) [9].

(*) En application des décisions de l'Union internationale de Biochimie, les résultats doivent être exprimés en unités définies comme le nombre de micromoles de substrat libérées par minute.

Le plasminogène précipite principalement dans la fraction III de Cohn [118] mais se retrouve aussi dans la fraction I en quantité non négligeable. Il est présent dans la fraction P de Kekwick [277].

Localisation.

Cette protéine se trouve dans le plasma, le sérum, la lymphe, certaines humeurs, les exsudats et les transsudats. Sa présence dans les granulocytes éosinophiles de la moelle osseuse [46] a conduit à une hypothèse concernant le rôle de ces éléments figurés dans la réaction inflammatoire [46]. Sa concentration dans les différents milieux biologiques serait proportionnelle à celle du fibrinogène [112].

Propriétés physiques.

Le poids moléculaire du plasminogène, estimé par Shulman et coll. [500] à 143 000, serait selon Davies et Englebert [128] de 83 000.

Les principales constantes physiques de cette protéine sont résumées dans le *tableau* X :

TABLEAU X

Principales constantes physiques [128], [500]	
Sédimentation $S_{20,w}$ (unité Svedberg)	4,3
Diffusion, $cm^2 \times sec.^{-1}$	$4{,}31 \times 10^{-7}$
Volume spécifique partiel, $cm^3 \times g^{-1}$	0,71
Viscosité intrinsèque g/100 ml	0,08
Mobilité électrophorétique à *p*H 2,9 $cm^2/V.^{-1} sec.^{-1}$ à *p*H 4,95	+ 6,6 + 2,0
Point iso-électrique	*p*H 5,5 à 6,0

La constante de sédimentation du plasminogène très purifié – 123 unités caséinolytiques Remmert et Cohen par mg d'azote – a été estimée à 3,9 unités Svedberg [461].

Le plasminogène est très peu soluble dans l'eau à *p*H 7 [402] et sa solubilité est considérablement accrue en présence de lysine [402].

Propriétés chimiques.

Récemment Robbins et coll. [462] ont montré que le plasminogène présente comme la plasmine une structure à deux chaînes liées par des ponts disulfures et s'en différencie par les acides aminés en position N-terminale et carboxy-terminale.

L'activation du plasminogène peut se produire sous l'influence de facteurs très divers et s'accompagne d'une diminution de son poids moléculaire de 10 à 25 pour 100 [9] consécutive à la libération de peptides [9] et non à la libération d'hexoses [284], [500]. Dans le *tableau* XI sont rassemblés les principaux modes d'activation du plasminogène.

L'activation par la streptokinase nécessite la présence d'une protéine, appelée pro-activateur, présente dans le plasma humain [411]. Cependant, très récemment Kline a émis l'hypothèse d'une action directe de la streptokinase sur le plasminogène humain [286]. L'activation par des enzymes divers d'origine animale ou bactérienne peut être spécifiquement inhibée par des acides aminés et dérivés divers dont le plus connu est l'acide ε - amino-caproïque, utilisé à cet effet en thérapeutique.

Le dosage du plasminogène peut être réalisé par différentes méthodes qui sont toutes fondées sur leur activation et sur la détermination de l'activité enzymatique de la plasmine formée [490].

Mode d'obtention et de purification du plasminogène.

Le plasminogène est préparé à partir de la fraction III de Cohn [8], [114], [281], [285]. Il est purifié par chromatographie sur DEAE-cellulose [563], sur carboxyméthyl-cellulose [211] et par filtration sur gel Séphadex [461].

TABLEAU XI

Principales formes d'activation du plasminogène

Nature de l'activation	Activateurs	Auteurs
Spontanée		Mole (1948) [397].
Enzymatique	Sanguin :	
	Activateur englobulinique	Lewis et Ferguson (1951) [333]. Flute [1960) [188]. Fearnley et coll. (1952) [172], [175].
	Erythrokinase	Johnson et coll. (1964) [264].
	Plasmine	Astrup, Sterndorff (1952) [32]. Alkjaersig et coll. (1958) [8].
	Leucocytes	Gans (1964) [196].
	Tissulaire : Fibrinokinase ou Cytokinase	Astrup et Permin (1947) [31]. Astrup (1966) [25]. Werren (1963) [565].
	Pancréatique : Trypsine	Jackson et Mertz [1954) [259]. Alkjaersig et coll. (1958) [9]. Hagan et coll. (1960) [211].
	Prostatique :	Tagnon et coll. (1952) [522].
	Urinaire : Urokinase [83]	Alkjaersig et coll. (1958) [9]. Ploug, Kjeldgaard (1957) [448]. Celander, Guest (1960) [102].
	Bactérien : Streptokinase [in 463], [554]	Tillett et Garner (1933) [529]. Christensen (1954) [112]. Kline, Ts'ao (1967) [286].
	Staphylokinase [333]	Davidson (1960) [127]. Lack C.H. (1948) [302].
Chimique	Chloroforme :	Christensen (1946) [110]. Mac Farlane (1964) [357].
	Glycérol :	Alkjaersig et coll. (1958) [8]. Sgouris et coll. (1950) [490].
	Dérivés de l'urée :	Von Kaulla, Smith (1961) [557], [558].

B. — FIBRINOLYSE. MÉCANISME DE LA RÉACTION

Le rôle physiologique de la fibrinolyse est de permettre in vivo la dissolution des thrombi (thrombolyse). Il s'agit dans ces conditions d'une réaction très complexe mettant en jeu des mécanismes d'activation et d'inhibition qu'Ambrus a récemment schématisés de la façon suivante :

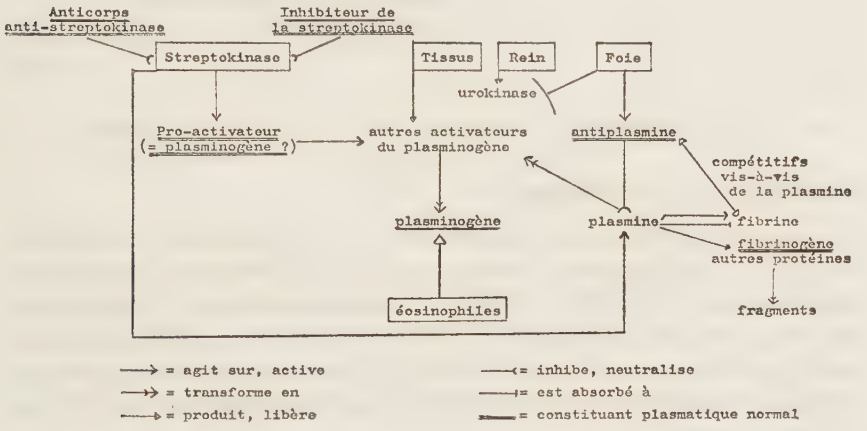


Fig 11. — Schéma des mécanismes d'activation et d'inhibition de la fibrinolyse d'après Ambrus [14].

Au point de vue biochimique, l'élément dominant est l'apparition dans le milieu d'un enzyme protéolytique, la plasmine, dont l'action peut tout aussi bien s'exercer sur le fibrinogène (fibrinogénolyse) que sur la fibrine (fibrinolyse), ceci dépendant de la présence ou non de thrombine. La fibrinogénolyse et la fibrinolyse peuvent être schématisées de la façon suivante :

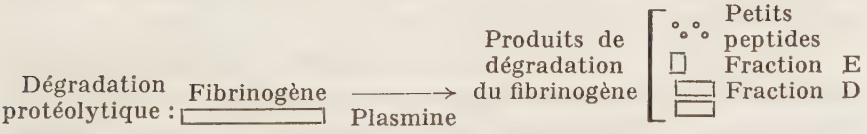


Fig. 12. — Schéma de la fibrinogénolyse d'après Bang (1967) [43].

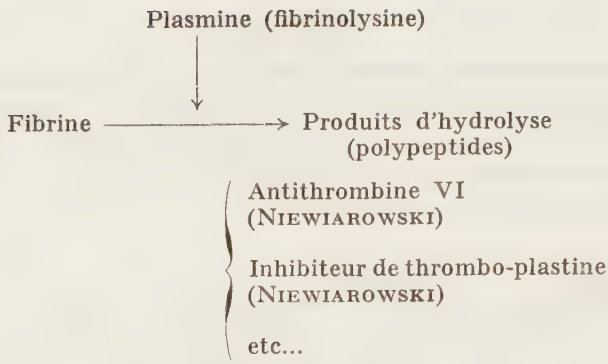


Fig. 13. — Schéma de la fibrinolyse d'après Astrup (1956) [25].

1. Produits de la réaction.

La protéolyse du fibrinogène ou de la fibrine par la plasmine conduit à deux peptides thermolabiles [434], de poids moléculaire relativement élevé [255], [484], eux-mêmes résistants à la plasmine et désignés par les lettres D et E. Ces deux produits ont été isolés par ultra-centrifugation [498], électrophorèse [498], immuno-électrophorèse [183], [202], [432] et chromatographie sur DEAE cellulose [434].

Le produit D représenterait entre 50 à 70 pour 100 de la quantité de fibrinogène ou de fibrine protéolysée [434], [493], [498] alors que le produit E n'en représenterait que 15 à 20 pour 100 [434].

Fletcher et coll. en 1965 [183] ont étudié la fibrinogénolyse par la plasmine et ont déterminé le poids moléculaire, la constante de sédimentation et l'antigénicité de ces fractions (*tableau* XII).

Des résultats, concernant l'étude physique des composés D et E, ont été trouvés du même ordre de grandeur en 1967 par Nanninga et Guest [416].

Trois autres fractions thermostables et de poids moléculaire faible [432], [434] figurent également parmi les produits de la réaction de la plasmine sur le fibrinogène de la fibrine. Ils sont désignés par les lettres A, B, C, et ne sont pas antigéniques.

TABLEAU XII

Tableau d'identification des principaux produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine [183]

	Constante de sédimentation S	Poids moléculaire	Groupe antigénique
Fibrinogène avant digestion	non calculée	350 000	multiple (XCDE)
Production de réaction finale de digestion par la plasmine	5,27 3,0 1,4	88 000 30 000 faible	D E —

Tous ces produits sont susceptibles de modifier à certaines concentrations les réactions de fibrino-formation. Cette propriété biologique des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine a fait l'objet de nombreux travaux récents [253], [292], [534]. Selon Godal et Helle [200] les produits résultant de la fibrinolyse auraient un effet anticoagulant inférieur à ceux résultant de la fibrinogénolyse. L'activité de ces produits est résumée dans le *tableau* XIII.

Comme l'indique ce tableau, les produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine sont susceptibles d'inhiber la fibrino-formation par trois mécanismes :

— une action antithrombine [293], [420], [533] ;

— un effet inhibiteur sur la polymérisation du monomère de fibrine [12], [292], [324], [534] ;

— une action inhibitrice sur la génération de la thromboplastine [293], [422], [535].

L'antithrombine VI de Niewiarowski [420] a d'abord été assimilée à l'un des deux composants principaux (D) des produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine [293].

TABLEAU XIII

Activités biologiques des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine par la plasmine

Activité biologique	Facteur responsable de l'activité	Auteurs
Antithrombine	Antithrombine VI	Niewiaroski, Kowalski (1958) [420].
	Anticoagulant Fraction of Incubated Fibrinogen (AFIF)	Triantaphyllopoulos (1958) [533].
	Antithrombine VI (un des composants électrophorétiques D)	Kowalski et coll. (1960) [293].
	Composant D	Nussenzweig et coll. (1961) [433].
Inhibiteur de la polymérisation du monomère de la fibrine	Antithrombine VI (un des composants électrophorétiques D)	Kowalski et coll. (1964) [292]. Latallo et coll. (1964) [324].
	Anticoagulant Fraction of Incubated Fibrinogen (AFIF)	Triantaphyllopoulos (1965) [534].
Inhibiteur de la thromboplastinoformation	Inhibiteur de la génération de thromboplastine (IGT)	Niewiarowski et coll. (1959) [422].
	Composant E (AFIF)	Kowalski et coll. (1960) [293]. Triantaphyllopoulos (1967) [535].
Inhibiteur des fonctions plaquettaires (adhésion, agrégation et métamorphose visqueuse)	Produits de dégradation	Kowalski et coll. (1964) [295]. Hirsch et coll. (1965) [253].
Facteur d'hémagglutination	Produits de dégradation	Latallo et Walewska (1959) [325].
Facteurs vascularo-toxiques (causes d'hémorragies)	Produits de dégradation	Berg et Field (1954) [51].

TABLEAU XIV

Tableau des principaux inhibiteurs de la plasmine et inhibiteurs de l'activation du plasminogène

	Anti-activateurs	Antiplasmines
Inhibiteurs physiologiques	*Inhibiteur de* Shulman [496], polypeptide, PM 17 000, inhibiteur des systèmes de fibrinolyse et de coagulation. *Antilysokinases* (immunoglobulines) [552]. Antistreptokinases [329]. Antistaphylokinases [329].	*Antiplasmine progressive*, non compétitive, irréversible (α_1-globuline) [194], [431]. Antiplasmine immédiate, compétitive, réversible (α_2-globuline) [194], [431]. Antiplasmine plaquettaire [269], [400], [562]. Antiplasmines tissulaires [143].
Inhibiteurs non physiologiques	*Lysine* [407]. *Ornithine* [407]. *Esters de la lysine* [9]. *Esters de l'arginine* [9]. *Acide amino-caproïque* EACA [2], [4], [10], [154], [193], [424], [436], [437], [541]. *Diisopropylfluorophosphate DFP* [296]. *Acide 4-aminométhyl-cylohexane-carboxylique* AMCHA [361], [438], [442]. *Acide para-aminométhylbenzoïque* PAMBA [342]. *Inhibiteurs de* Frey *et de* Kunitz [48], [508], [513].	*Inhibiteurs synthétiques* Organophosphates [296], [405] comme le DPF [296]. Sels métaux lourds [296], [405] (cuivre, nickel, cobalt, zinc). AMCHA [438]. EACA [10], [101], [542]. Héparine [301], [555]. Lysine [407]. Ornithine [407]. Esters de lysine et d'arginine [539]. *Inhibiteurs naturels végétaux* Inhibiteur de la fève du soja (SBTI, STI) [113], [285], [299] [510], [523]. Inhibiteur de la graine d'arachide (PNTI) [27], [84]. *Inhibiteurs naturels animaux d'origine tissulaire* [358] Inhibiteur pancréatique de peptidase (Kunitz) [299], [300], [544], polypeptide, PM 9 000. Inhibiteur parotidien de la kallicréine (Frey) [513], polypeptide, PM 11 600 [544]. Inhibiteur urinaire de trypsine (Astrup) [33]. Inhibiteur pulmonaire trypsine (Astrup) [21], [22].

Cette antithrombine représenterait en fait la somme de deux activités liées à des produits de dégradation de même comportement immuno-électrophorétique mais dont l'un, l'antithrombine, est formé précocement tandis que l'autre, inhibiteur de la polymérisation du monomère de fibrine, apparaîtrait plus tardivement [292].

L'inhibiteur de génération de thrombo-plastine (IGT) de Niewiarowski [422] est assimilé par Kowalski et coll. [293] au composant E.

2. Activation et inhibition de la fibrinolyse.

Nous avons précédemment étudié les activateurs du plasminogène (cf. *tableau XI*). A côté de la plasmine, d'autres enzymes protéolytiques sont susceptibles de réaliser la fibrinogénolyse et la fibrinolyse. Parmi ces enzymes, la trypsine [420], [422] et la pronase [380], [381] ont été particulièrement étudiées. Cette dernière, enzyme protéolytique du *Streptomyces griseus*, a permis à Mester et coll. d'isoler à partir du fibrinogène trois glycopeptides contenant 80 pour 100 des oses présents dans la molécule [381].

De nombreux inhibiteurs de la fibrinolyse ont été identifiés comme l'indique le *tableau* XIV.

Il faut signaler d'autre part, que l'activation du FSF par la thrombine et le calcium ionisé rend le caillot plus résistant à la protéolyse par la plasmine [58].

III. — MÉTHODES DE MESURE DE LA FIBRINOFORMATION ET DE LA FIBRINOLSYE

De nombreuses méthodes ont été proposées pour mesurer ces deux réactions. Les plus couramment utilisées pour l'analyse du sang total sont en général des méthodes semi-quantitatives. Les méthodes plus précises et plus spécifiques sont pratiquées à partir du plasma, du précipité d'euglobulines plasmatiques ou d'une solution de fibrinogène. Nous avons rassemblé dans les *tableaux* XV et XVI les principales de ces méthodes.

TABLEAU XV

PRINCIPALES MÉTHODES DE MESURE DE LA FIBRINO-FORMATION

Méthodes			Sang total, plasma ou solution de fibrinogène
Physiques	Visuelles et chronométriques		SCHNEIDER (1952) [476]. BOWMAN et YELITO (1957) [85]. Von CLAUSS (1957) [551]. DESTAING et coll. (1960) [141].
	Viscosimétriques		AYMERICH et coll. (1951) [35].
	Electriques	Mesures de résistivité	RICHARDON et BISHOP (1953) [458].
		Mesures photo-électriques	FAZAL MOHAMMAD (1967) [170]. HARROWER et BROOK (1967) [219].
	Opacimétriques		PARFENTJEV et coll. (1953) [445]. VINCENT et coll. (1962) [549].
	Thrombo-élastographiques		SOKAL (1960) [506], [507]. MARCHAL et coll. (1962) [368]. RABY (1966) [451]. SAMAMA et coll. (1966) [469].
	Thrombophotographiques		GUILLOT et FIEHRER (1965) [210].
Chimiques	Gravimétriques		LIAN et coll. (1936) 335 . LEROUX et coll. (1952) [331].
	Colorimétriques		MARENZI et coll. (1951) [370]. RATNOFF et MENZIE (1951) [455]. Le POLLES et FROCRAIN (1959) [328]. REINER et CHEUNG (1959) 546 . ARDRY (1960) [18]. TRAISNEL et DOUMER (1960) [532]. LAZAR (1967) [326].
	Spectrophotométriques		LAKI (1951) [306]. JACOBSSON (1955) [260]. BLOMBAECK et BLOMBAECK (1956) [69]. BERGSTRÖM et coll. (1960) [53]. MOSESSON (1962) [402].

TABLEAU XVI

Principales méthodes de mesure de la fibrinolyse

Méthodes		Sang total ou plasma	Euglobulines	Enzymes fibrinolytiques
Physiques	Visuelles et chronométriques.	Mac Farlane (1937) [356]. Christensen (1949) [11]. Dausset (1956) [126]. Billimoria (1959) [60]. Niewiaroski (1959) [423]. Fearnley (1960) [171], [173], [174], [176]. Clifton (1961) [116]. Iatridis (1961) [258]. Blix (1962) [63]. Thornes (1963) [528].	Milston (1941) [394]. Copley (1954) [122]. Niewiarowski (1959) [423]. Lackner (1960) [304]. Blix (1961) [62]. Von Kaulla (1963) [554].	Loomis (1947) [343]. Christensen (1949) [111]. Alkjaersig (1958) [9].
	Thrombo-élastographiques	Cacciola (1960) [91]. Bertrand (1965) [55]. Migne (1966) [385].	Von Kaulla (1958) [556]. Cacciola (1960) [91].	
	Electrophorèse de gel de fibrine-agar	Heimburger (1962) [247], [248]. Thornes (1963) [527].		
	Gravimétriques	Favre-Gilly (1965) [169].		

Chimiques	Colorimétriques	Bidwell (1953) [59]. Fearnley (1960) [171]. Ogston (1961) [435].		
	Spectrophotométriques	Billimoria (1959) [60].		Bergström (1961) [547]. Mosesson (1963) [402] [403].
	Fluorimétriques	Strassle (1963) [516].		Maxwell (1962) [347].
Isotopiques	Fibrinogène marqué	Alkjaersig (1959) [11]. Clément (1959) [115]. Sawyer (1960) [427]. Dudok De Wit (1962) [151], [152].		Shulman (1950) [501].
Enzymatiques	Substrat de fibrine noéformée	Christensen (1949) [111]. Niewarowski (1959) [421].	Johnson (1952) [265]. Niewiarowski (1959) [419]. Dray (1966) [150].	Niewiarowski (1959) [421].
	Plateaux de fibrine [30], [320].	Müllertz (1956) [409], [411]. Lassen (1958) [321], [322]. Blix (1964) [65].	Astrup (1952) [30]. Müllertz (1955) [408] Von Kaulla (1958) [556]. Blix (1962) [64].	Astrup (1952) [30]. Lassen (1952) [320].
Immonologiques			Ferreira (1963) [177] Strassle (1963) [516]	

La mesure de la fibrino-formation fait appel à des méthodes physiques et chimiques alors que celle de la fibrinolyse est réalisée à l'aide de méthodes plus variées (physiques, chimiques, enzymatiques, isotopiques et immunologiques).

CONCLUSION

Nous avons tenté dans le présent chapitre de faire ressortir la multiplicité des travaux consacrés à l'étude de la fibrino-formation et de la fibrinolyse, étapes essentielles de la coagulation sanguine et de la thrombolyse.

Ces deux réactions ont une importance toute particulière en raison de l'équilibre physiologique que l'organisme doit maintenir, équilibre instable que des états pathologiques, des facteurs diététiques ou endocriniens, et des agents pharmacologiques sont susceptibles de perturber.

*

* *

CHAPITRE II

INTRODUCTION.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE GLOBALE AU THROMBO-ELASTOGRAPHE.

I. Étude des conditions d'obtention d'un caillot de fibrinone standard. Mesure de la fibrino-formation au thrombo-élastographe.

II. Etude de la lyse du caillot de fibrine standard. Mesure de la fibrinolyse au thrombo-élastographe.

ÉTUDE PARALLÈLE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE PAR LES MÉTHODES ENZYMATIQUES.

I. Méthode caséinolytique.

II. Méthode de dosage de la fibrine protéolysée.

INTRODUCTION

L'exposé, fait au chapitre précédent, sur la biochimie de la fibrino-formation et de la fibrinolyse, montre à quel point le plasma constitue un milieu complexe dans lequel interfèrent des activateurs et des inhibiteurs de la coagulation et de la fibrinolyse. En outre, le fibrinogène ne représente que 4 pour 100 des protéines totales du plasma normal. Son taux varie d'un plasma à l'autre entre 0,3 g et 0,5 g pour 100 ml.

Dans ces conditions, les tracés thrombo-élastographiques obtenus au cours de la formation et de la lyse d'un caillot plasmatique ne peuvent pas se prêter à une comparaison précise avec la mesure biochimique de l'activité des enzymes intervenant dans la réaction.

Par contre, l'utilisation d'un milieu simple, composé de fibrinogène coagulé par addition de thrombine, fait de ce milieu un substrat sensible, constant et reproductible.

L'étude des conditions expérimentales de mesure, au thrombo-élastographe, de la formation et de la lyse d'un caillot de fibrine, constitue la première partie de ce chapitre. Dans la seconde partie, sera mesurée l'activité des mêmes enzymes sur deux types de substrats, la caséine d'une part, la fibrine d'autre part.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE GLOBALE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE

Dans cette première partie, nous analyserons successivement l'influence des différents facteurs intervenant au cours de la fibrino-formation d'une part, au cours de la fibrinolyse d'autre part.

I. ÉTUDE ANALYTIQUE DE LA FIBRINO-FORMATION AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE

A. — Choix d'une dose de thrombine.

Dès les premiers travaux sur la thrombo-élastographie, le rôle de la concentration du milieu en thrombine dans la fibrino-formation et son influence sur les constantes du tracé, a été souligné par de nombreux auteurs [330], [449], [506]. Astrup [29] a récemment montré l'influence de la concentration en thrombine sur la coagulation d'une solution pure de fibrinogène. Compte tenu du substrat et du milieu que nous nous proposons d'utiliser au cours de notre travail, nous avons cherché à préciser la concentration optima de thrombine nécessaire. A cet effet, une série de tracés est réalisée au thrombo-élastographe à partir d'une solution déterminée de fibrinogène en présence de quantités variables de thrombine.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène :

Fibrinogène bovin A (*) . . . . . 1 g
Tampon phosphate (**) pH 7,4 q.s.p. 100 ml

— Solution-mère de thrombine :

Thrombine bovine . . . . . 100 u.M. (***)
Tampon phosphate *p*H 7,4 q.s.p. 5 ml

— Dilutions de la solution-mère de thrombine :

Solution-mère de thrombine*	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon phosphate *p*H 7,4*	0,5	1,5	2,0	4,5	9,5	19,5	39,5	79,5
Dilutions	1/2	1/4	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Conc. finale en u.M. par ml	10	5	4	2	1	0,5	0,25	0,125

* en ml.

Technique :

Dans la cuve du thrombo-élastographe sont introduits successivement :

Solution de fibrinogène . . . . . 0,25 ml
Solution de thrombine (dilution choisie) . . . 0,10 ml

(*) Fibrinogène bovin Armour. Cette concentration est choisie en raison du fait que ce fibrinogène contient environ 50 pour 100 de protéines coagulables, ce qui conduit à une concentration réelle finale peu différente de 0,5 pour 100 ml, donc voisine de celle du plasma humain.

(**) Tampon phosphate *p*H 7,4 :
Solution de phosphate monopotassique M/15 (9,08 g/litre): 19 2 ml
Solution de phosphate disodique M/15 (9,45 g sel anhydre)808 : ml

(***) Thrombine bovine Léo dont l'activité enzymatique est exprimée en unités Mellanby (U.M.).

L'appareil est mis en marche immédiatement après addition de la thombine en raison de la coagulation particulièrement rapide du fibrinogène. Le tracé est enregistré durant le temps nécessaire pour atteindre l'amplitude maxima puis ce temps est prolongé d'au moins 15 minutes. L'amplitude maxima apparaît sur l'échelle optique de l'appareil lorsque le spot lumineux atteint une déviation constante. Après arrêt de l'appareil, le papier est développé.

Résultats :

L'examen général des tracés montre que lorsque l'amplitude maxima est atteinte, les branches du tracé deviennent invariablement parallèles.

L'analyse de ces tracés révèle que la modification des diagrammes, sous l'influence de concentrations croissantes de throm-

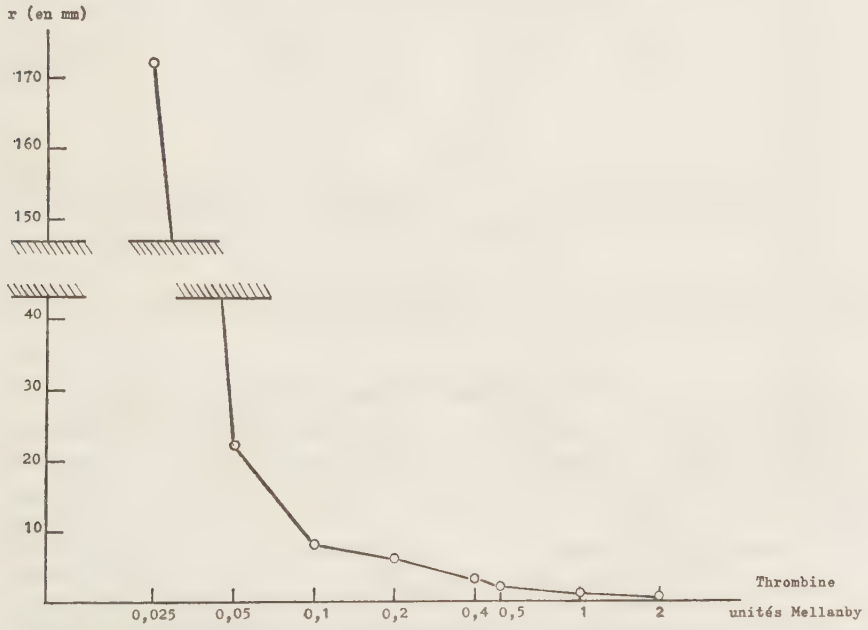


Fig. 14. — Variations de *r* en fonction de la quantité de thrombine ajoutée.

bine, se traduit essentiellement par une variation de l'angle α. La figure 14 montre que la constante *r* régresse très rapidement, pour une faible variation (0,025 à 0,1 u.M.) de la concentration en thrombine, puis ne varie plus. Il faut remarquer qu'à la concentration de 0,0125 u.M. il n'y a aucune coagulation dans les deux heures qui suivent. La constante *am* de ces tracés ne varie pas, dans les conditions de cette expérience, proportionnellement à la quantité de thrombine ajoutée.

En revanche, la figure 15 montre une augmentation progressive de l'angle α en fonction des concentrations croissantes de thrombine. Cette variation est proportionnelle pour des concentrations

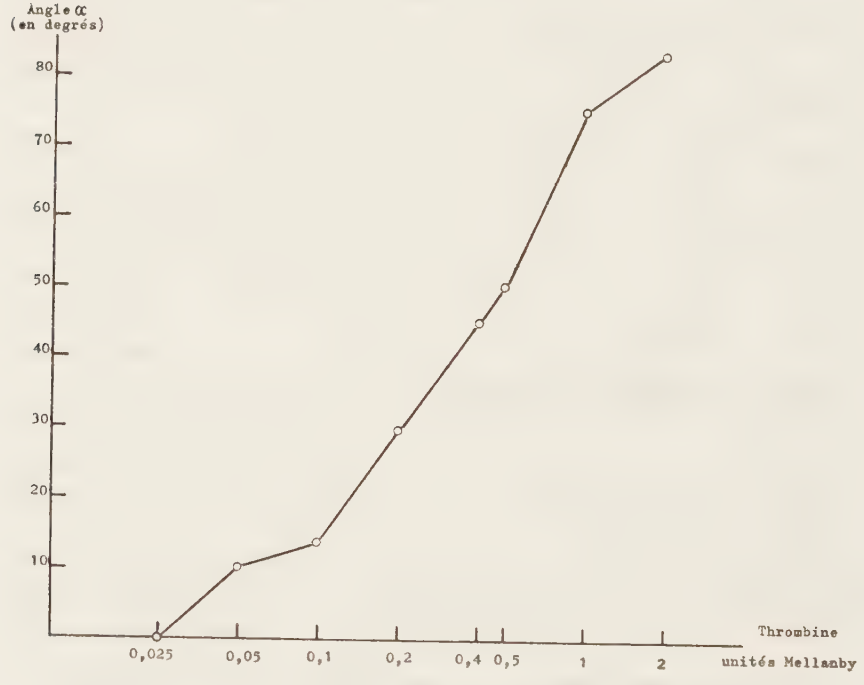


FIG. 15. — Variations de l'angle α en fonction de la quantité de thrombine ajoutée.

de thrombine comprises entre 0,05 et 0,5 u.M. On peut également exprimer la variation de la tangente à l'angle α (*figure* 16).

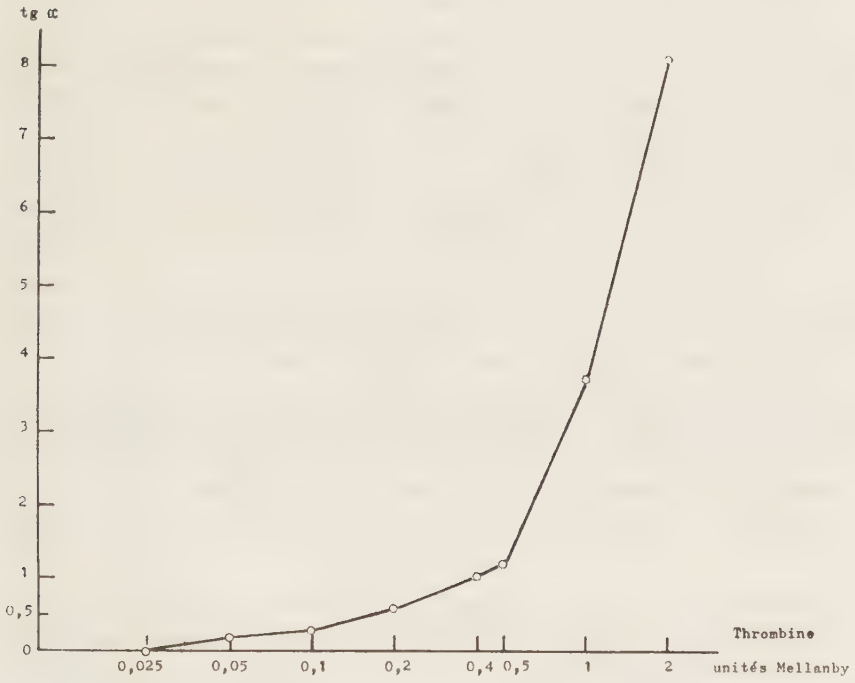


FIG. 16. — Variations de la valeur tangente α en fonction de la quantité de thrombine ajoutée.

Enfin, pour une faible concentration en thrombine (0,05 u.M.) le tracé *c* (*figure* 17) présente une anomalie qui mérite d'être soulignée. La constante *r* augmente en effet notablement et l'amplitude maxima ne diminue pas, bien au contraire (*tableau* XVII).

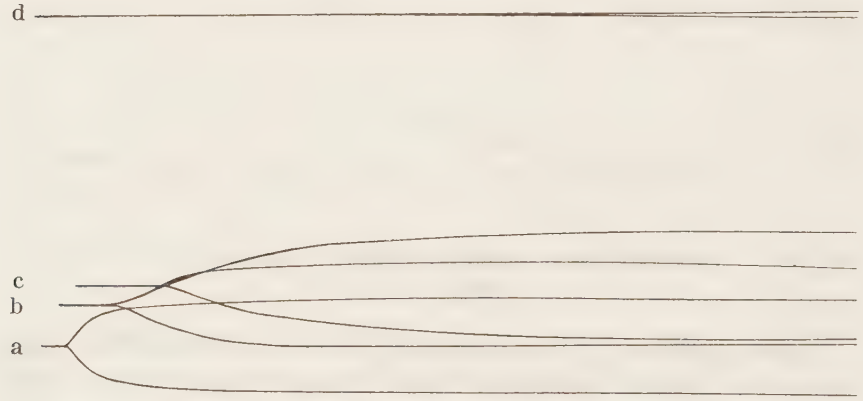
L'interprétation de ce phénomène, observé par certains auteurs pour les plasmas anormaux, semble actuellement mal connue. Il paraît logique de penser, comme l'ont montré GUILLOT et coll.

TABLEAU XVII

VARIATIONS DES CONSTANTES THROMBO-ÉLASTOGRAPHIQUES (α, *r*, *am*) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN THROMBINE DU MILIEU

Constantes	Concentrations en thrombine		
	0,05	0,1	0,2
α	10°	13°30	29°
r	22 mm	13 mm	6 mm
am	23 mm	17 mm	20 mm

[210] que la structure du caillot est influencée par la quantité de thrombine ajoutée. Pour de faibles quantités, l'édification du caillot est très lente et très progressive mais finit par aboutir à un caillot normal. Ce phénomène est, rappelons-le, observé chez



Tracé a : 2 u.M/ml
Tracé b : 1 u.M/ml
Tracé c : 0,5 u.M/ml
Tracé d : 0,25 u.M/ml

FIG. 17. — Tracés thrombo-élastographiques obtenus en fonction de la concentration de la solution de thrombine ajoutée (solution de fibrinogène Armour à 1 g pour 100 ml).

l'homme, dans la grande hémophilie [368] et dans les déficits en prothrombine, en Ac-globuline (proconvertine) ou en facteur VII (SPCA) [134].

En conclusion de ces résultats, nous devons noter la grande sensibilité du tracé thrombo-élastographique à la quantité de thrombine utilisée pour déclencher la coagulation. Dans les conditions décrites, retenons que la dose de 0,5 u.M. de thrombine, pour 0,25 ml d'une solution à 1 pour 100 de fibrinogène Armour, conduit à un tracé dont les constantes se rapprochent le plus de celles d'un plasma humain dépourvu de plaquettes [368].

B. — CHOIX D'UNE QUALITÉ ET D'UNE DOSE DE FIBRINOGÈNE

Les différentes préparations commerciales de fibrinogène bovin diffèrent entre elles du point de vue analytique, tant par leur teneur en protéines totales, protéines coagulables, enzymes (plasminogène, « fibrin stabilizing factor ») que par la présence de sels minéraux.

Nous avons donc tout d'abord comparé quatre préparations différentes, puis étudié pour l'une d'entre elles, l'influence de la concentration en fibrinogène sur le tracé de coagulation obtenu au thrombo-élastographe par addition d'une quantité fixe de thrombine.

Comparaison de quatre préparations différentes de fibrinogène bovin.

Ces produits, choisis parmi les principales productions de fibrinogène bovin, sont désignés par les lettres A, B, C, D (*).

(*) Fibrinogène A : Armour Pharmaceutical Company.
Fibrinogène B : Calbiochem.
Fibrinogène C : Poviet.
Fibrinogène D : Warner & Chilcott.

Protocole.

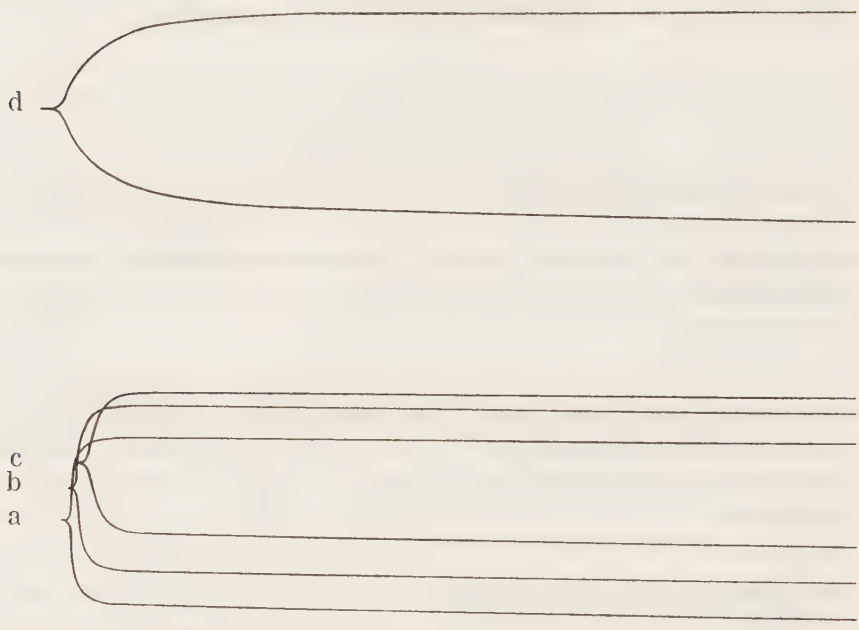
Réactifs :

— Solution de fibrinogène (A, B, C ou D).

Fibrinogène	1 g
Tampon phosphate *p*H 7,4 q.s.p.. . .	100 ml

— Solution de thrombine :

Trombine bovine.	100 u.M.
Tampon phosphate *p*H 7,4 q.s.p.	20 ml



Tracé a : Fibrinogène Calbiochem
Tracé b : Fibrinogène Poviet
Tracé c : Fibrinogène Armour
Tracé d : Fibrinogène Warner Chilcott

Fig. 18. — Tracés thrombo-élastographiques obtenus avec différentes préparations commerciales de fibrinogène (1 g pour 100 ml) et une même solution de thrombine (5 unités Mellanby par ml).

Technique :

0,25 ml de chacune des solutions de fibrinogène étudiées sont introduits dans une cuve du thrombo-élastographe puis coagulés par addition de 0,10 ml de solution de thrombine.

Le tracé est enregistré comme indiqué précédemment.

Résultats :

La *figure* 18 montre que les tracés thrombo-élastographiques correspondant aux produits B et C sont très voisins, alors que les tracés correspondant aux fibrinogènes A et D sont différents.

Ceci est confirmé par la mesure des constantes α, *am*, *r* et *K* assemblées dans le *tableau* XVIII.

TABLEAU XVIII

VARIATION DES CONSTANTES THROMBO-ÉLASTOGRAPHIQUES EN FONCTION DE DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS COMMERCIALES DE FIBRINOGÈNE

Constantes	Fibrinogène			
	A	B	C	D
α (degrés)	73	76	76	47
am (mm)	28	33	32	41
r (mm)	2	1,5	1,5	3,5
k (mm)	3	1	1	5,5

A = Armour
B = Calbiochem
C = Poviet
D = Warner & Chilcott

Les différences observées entre ces quatre préparations de fibrinogène bovin pourraient être attribuées à une différence dans leur teneur respective en protéines coagulables.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé, pour chacun des échantillons A, B, C, D, à un dosage des protéines coagulables. La méthode utilisée sera décrite dans la dernière partie du chapitre II. Elle est basée sur la coagulation du fibrino-

gène par la trombine, et le dosage du caillot de fibrine formé, après dissolution dans la soude, par la méthode du buiret.

Les résultats obtenus figurent au *tableau* XIX et sont comparés, dans le même tableau, aux amplitudes maxima mesurées sur les tracés correspondants. Ces résultats montrent que les divergences observées au thrombo-élastographe sont dans le même ordre que celles correspondant à la teneur en protéines coagulables des quatre produits étudiés.

TABLEAU XIX

Sol. fibrinogène	A	B	C	D
Taux de protéines coagulables (*)	4,96	5,73	5,70	10
Amplitude maxima	28	33	32	41

(*) Taux de protéines coagulables exprimé en mg de protéines coagulables par ml de solution utilisée.

A = Armour
B = Calbiochem
C = Poviet
D = Warner & Chilcott

En outre, on peut remarquer que la différence entre les deux fibrinogènes A et D :

$$\frac{\text{taux de protéines coagulables de A}}{\text{taux de protéines coagulables de D}} = \frac{4,96}{10} = 0,49$$

correspond à une variation de l'angle α de :

$$\frac{\text{angle } \alpha \text{ pour A}}{\text{angle } \alpha \text{ pour D}} = \frac{73}{47} = 1,55$$

Or, il est intéressant de noter que lorsque nous avions étudié (*paragraphe IA*) l'influence de doses variables de thrombine pour une même solution de fibrinogène, nous avions constaté qu'une variation de la dose de thrombine :

$$\frac{\text{dose forte de thrombine}}{\text{dose faible de thrombine}} = \frac{0,5 \text{ u.M.}}{0,2 \text{ u.M.}} = 2,5$$

entraînait une variation de l'angle :

$$\frac{\text{angle } \alpha \text{ pour 0,5 u.M. de thrombine}}{\text{angle } \alpha \text{ pour 0,2 u.M. de thrombine}} = \frac{50}{29} = 1{,}7$$

Dans les 2 cas, la variation de l'angle α est donc du même ordre.

Ceci tend à montrer que les constantes du tracé dépendraient directement du rapport entre la quantité de protéines coagulables présente dans le milieu et la quantité du trombine ajoutée.

La constante α paraît particulièrement sensible à cet effet.

Influence de la quantité de fibrinogène, exprimée en taux de protéines coagulables, sur le tracé thrombo-élastographique.

Nous avons étudié, pour l'un des produits précédents, le fibrinogène A, les variations du tracé, en fonction de la concentration en protéines coagulables du milieu.

Protocole.

Réactifs.

— Solution-mère de fibrinogène :

Fibrinogène A contenant 49,6 g pour cent de protéines coagulables. . . . . 5 g
Tampon phosphate *p*H 7,4 q.s.p. . . . . 100 ml

— Dilutions :

Solution-mère de fibrinogène (ml)	0,4	8	12	16	20	24	32	48	64
Tampon phosphate *p*H 7,4 (ml)	9,6	92	88	84	80	76	68	52	36
Concentrations finales (g pour 100)	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,6	2,4	3,2

Technique.

Chaque dilution correspondant à une concentration déterminée en fibrinogène A, donc en protéines coagulables, est introduite dans la cuve du thrombo-élastographe sous un volume constant de 0,25 ml.

La thrombine est ajoutée à la dose de 0,5 u.M. et le tracé enregistré comme précédemment.

Résultats.

La *figure* 19 montre que la constante angulaire α des différents tracés obtenus croît lorsque les concentrations en fibrino-

FIG. 19. — Variations de l'angle α en fonction de la concentration de la solution de fibrinogène.

gène augmentent elles-mêmes de 0,2 à 1,2 pour 100. Puis α ne varie pratiquement plus, au-delà de cette concentration en fibrinogène.

La constante *am* (*figure* 20), qui varie également en fonction de la concentration en fibrinogène, continue d'augmenter au-delà des limites précédentes.

Il semble que cette courbe présente l'aspect d'une sigmoïde, ce qui avait été signalé lors de l'enrichissement en fibrinogène d'un plasma déplaquetté [506].

Enfin, la constante *r*, assez élevée pour une très faible quantité de fibrinogène, décroît, passe par un minimum puis augmente à nouveau, comme le montrent les résultats rassemblés au *tableau XX*.

TABLEAU XX

Concentrations (g pour 100) en fibrinogène A	0,2	0,5	1	2	4	5
r (mm)	4	2,5	2	3	4	5

A = Armour.

Il est certain que, en vue des études envisagées ultérieurement sur la lyse du caillot de fibrine, il sera hautement préférable de disposer d'un milieu très rapidement coagulable, afin de réduire au minimum les interférences entre la fibrino-formation et la fibrinolyse.

C'est pourquoi, nous adopterons une concentration en fibrinogène Armour correspondant à une valeur minimum du temps de latence *r*. Ce choix est d'autant plus valable qu'à cette même concentration la valeur de l'angle α est maximum. De plus, nous nous trouvons dans la partie linéaire de la courbe des amplitudes, ce qui permet de penser qu'il pourra y avoir dans ces conditions un rapport direct entre les variations de l'amplitude et le degré de fibrinolyse.

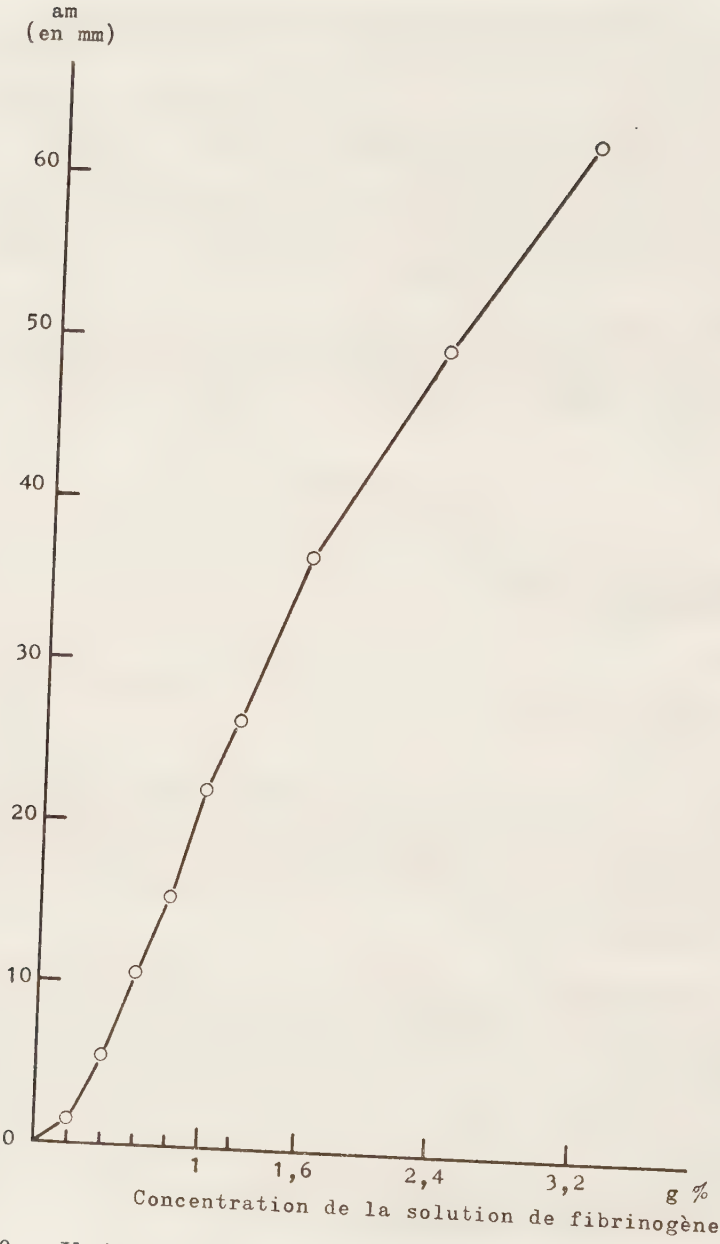


FIG. 20. — Variations de *am* en fonction de la concentration de la solution de fibrinogène.

C. — DÉTERMINATION DU *p*H OPTIMUM

La transformation du fibrinogène en fibrine sous l'action de la thrombine est une réaction enzymatique qui varie en fonction du *p*H. Il convient donc de déterminer le *p*H optimum de formation, au thrombo-élastographe, d'un caillot de fibrine standard.

Protocole.

Réactifs :

— Solutions de fibrinogène Armour à 1 pour 100 :

Fibrinogène Armour	1 g
Tampons phosphates (*) à *p*H variant de *p*H 6,50 à *p*H 9,50 q.s.p.	100 ml

— Solutions de thrombine 5 u.M./ml dans les mêmes tampons.

Technique :

0,25 ml de la solution de fibrinogène correspondant à un *p*H déterminé + 0,10 ml de la solution de thrombine correspondante.

Le tracé est enregistré comme indiqué précédemment.

Résultats.

La *figure* 21 rassemble les variations, en fonction du *p*H, des constantes α, *am* et Em du tracé thrombo-élastographique.

Le *p*H optimum est identique pour ces trois paramètres et se situe à 7,5. Ce résultat est en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs pour la coagulation plasmatique.

Dans ces conditions le tampon phosphate de *p*H 7,4 utilisé au cours des essais précédents se situe dans la zone optima et convient donc parfaitement à ces essais.

(*) Ces tampons sont préparés soit par un mélange de solutions de même molarité de phosphate disodique et de phosphate trisodique, soit par un mélange de solutions $\frac{M}{15}$ (volumes variables) de phosphate monopotassique (*p*H 4,55) et de phosphate disodique (*p*H 9,24).

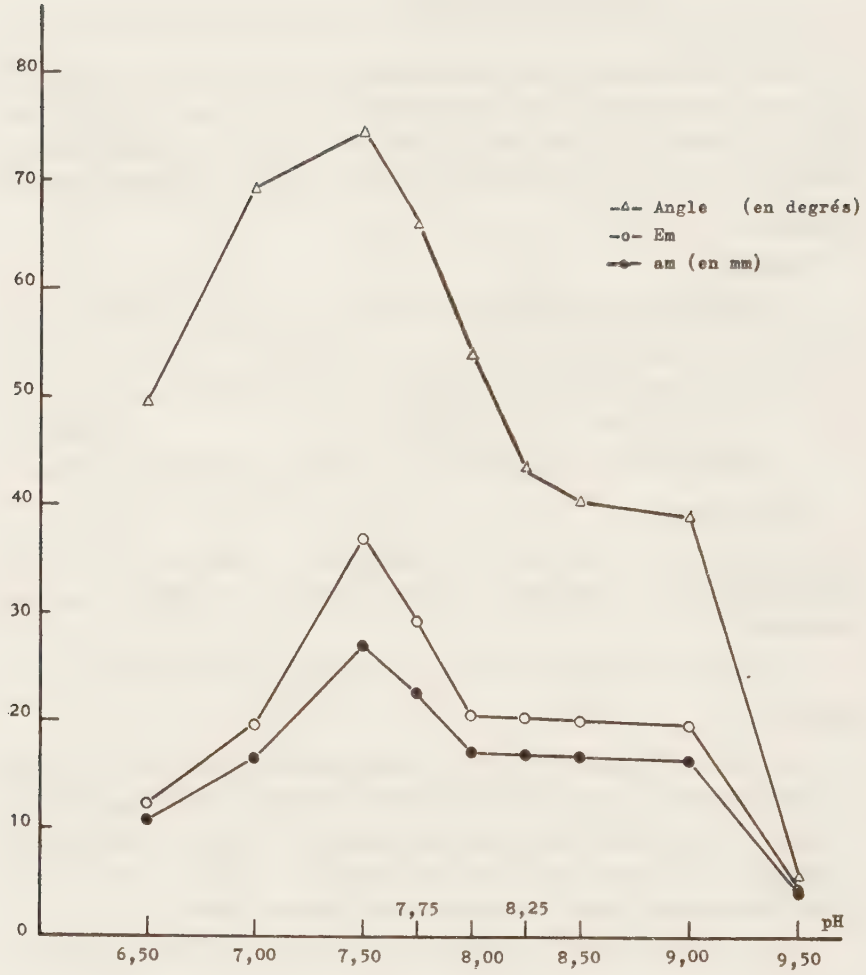


FIG. 21. — Variations de l'angle α, de Em et de *am* en fonction du *p*H.

Il est par ailleurs intéressant de noter que lorsque au *p*H optimum les constantes α et Em atteignent leur valeur maxima, la constante *r* (*figure* 22) atteint une valeur minima, ce qui montre bien que le phénomène concerne aussi bien la rapidité de formation du caillot que la qualité de celui-ci.

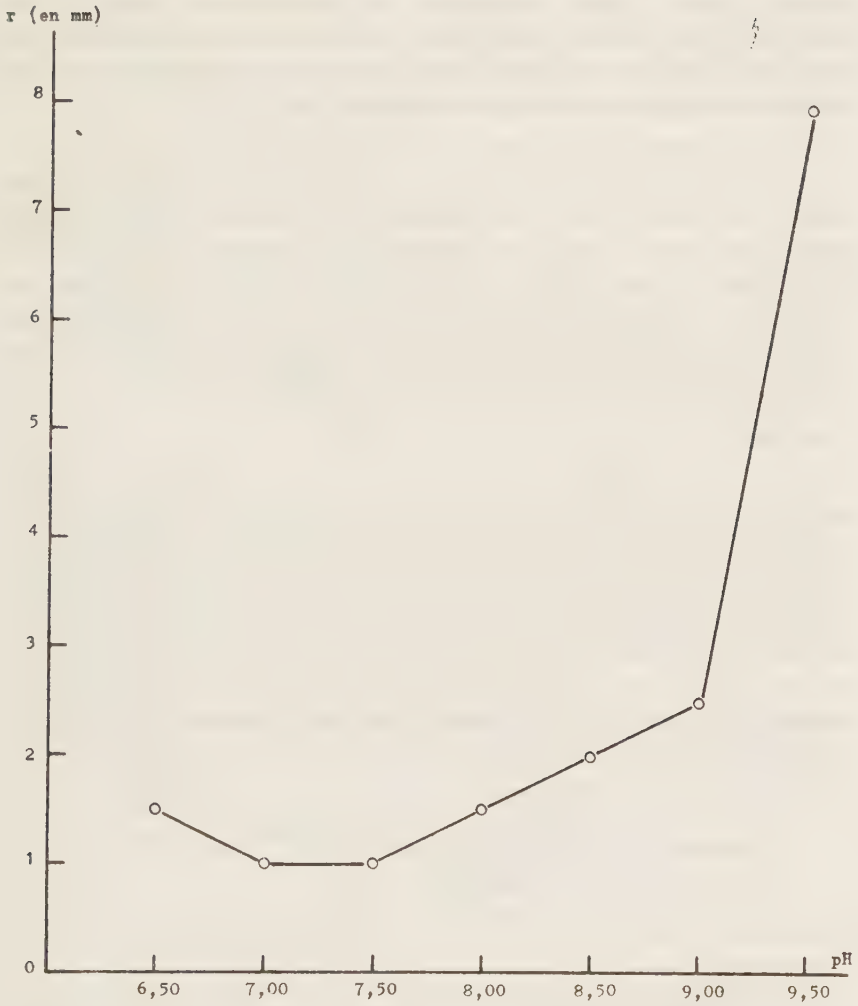


FIG. 22. — Variations de r en fonction du pH.

D. — INFLUENCE DES IONS CALCIUM

Le rôle des ions calcium dans la coagulation est bien connu. Dans le cas particulier d'une solution de fibrinogène, le

calcium ionisé agit en favorisant, par activation, l'intervention d'un enzyme présent dans les préparations commerciales de fibrinogène bovin et désigné sous le terme de « fibrin stabilizing factor » (facteur stabilisant la fibrine).

Il est certain que le milieu dans lequel ont été réalisés tous les tracés précédents n'est pas un milieu totalement décalcifié. Mais d'un autre côté, les préparations commerciales de fibrinogène renferment, en raison même de leur procédé de fabrication, des quantités non négligeables de citrate de sodium. Dans ces conditions, il nous a paru utile de déterminer l'influence d'un excès de calcium ionisé sur le tracé de coagulation, au thrombo-élastographe, de la solution de fibrinogène.

Protocole.

Pour la réalisation de cet essai, il est impossible d'utiliser un tampon phosphaté en raison de la précipitation des phosphates alcalins en présence de chlorure de calcium, par formation de phosphate de calcium. Nous avons donc, dans ce cas, utilisé un tampon de même *p*H mais de composition différente qui ne modifie pratiquement pas les tracés thrombo-élastographiques par rapport à ceux obtenus à l'aide du tampon phosphate. Ce tampon, exempt de phosphate, est un tampon (*) Barbital sodique également utilisé par différents auteurs [469].

Réactifs :

— Solution de fibrinogène Armour à 1 pour 100 dans le tampon Barbital sodique.

(*) Solution tampon Barbital sodique *p*H 7,3 (Owren-Koller).

— Solution A :

Barbital sodique	7,36	g
Acétate de sodium	4,86	g
Eau distillée	250	ml

— Solution finale :

Solution A	250	ml
Solution de NaCl à 4,25 pour 100	250	ml
Solution 0,1 N d'acide chlorhydrique	217	ml
Eau distillée	683	ml

Ajuster éventuellement au *p*H-mètre à *p*H 7,3 ± 0,1.

— Solution de thrombine dans le tampon (5 u.M. au ml) Barbital sodique.
— Solution calcique de thrombine dans le tampon Barbital sodique contenant 0,1 M de chlorure de calcium anhydre.

Technique :

Sont introduits successivement dans la cuve du thrombo-élastographe :

Solution de fibrinogène. . . . . 0,25 ml
Solution de thrombine (normale ou calcique). . 0,10 ml

Le tracé est enregistré comme indiqué précédemment.

Ces essais sont répétés à plusieurs reprises sur une même solution de fibrinogène avec la solution ordinaire de thrombine d'une part, avec la solution de thrombine d'autre part.

Résultats.

Les résultats obtenus avec la solution de thrombine normale sont groupés dans le *tableau XXI*. Dans le *tableau XXII* figurent les résultats obtenus avec la solution de thrombine calcique 0,1 M. Dans ces tableaux nous nous sommes limités à la mesure de l'angle α et de l'amplitude maxima am.

TABLEAUX DES CONSTANTES α ET am DES TRACÉS DE COAGULATION FIBRINOGÈNE-THROMBINE EN PRÉSENCE OU NON DE CALCIUM 0,1 M DANS LA SOLUTION DE THROMBINE

TABLEAU XXI

THROMBINE NORMALE

Numéro d'essai	Angle α (degrés)	*am* (mm)
1	69	26
2	70	26,5
3	71	28
4	70,5	25,6
5	69	26

TABLEAU XXII

THROMBINE CALCIQUE

Numéro d'essai	Angle α (degrés)	*am* (mm)
1	73,5	38,5
2	72	37
3	72	37,5
4	72,5	38
5	72,5	38

Nous remarquons que l'addition d'un excès de calcium dans le milieu entraîne une augmentation de l'angle α et surtout de l'amplitude maxima.

Cet effet du calcium sur le tracé de fibrino-formation est vraisemblablement attribuable à l'activation d'un enzyme [312], [339], [460] présent dans les préparations commerciales de fibrinogène, enzyme qui est une transamidase [336], [337], [352], désignée généralement sous le terme de « fibrin stabilizing factor » (F.S.F.) en raison de sa propriété de modifier les qualités physico-chimiques du caillot de fibrine. LEROUX avait déjà mis en évidence, dans sa thèse, le rôle du F.S.F. comme variable dans l'amplitude du tracé [330]. Signalons que dans la suite de ce travail, nous n'avons pas introduit de calcium dans le milieu.

E. — DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE ADOPTÉE. ÉTUDE DE LA REPRODUCTIBILITÉ DU TRACÉ

1. Description de la méthode.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène :

Fibrinogène bovin, quantité correspondant à 0,5 g de protéines coagulables.
Tampon phosphate *p*H 7,4 q.s.p. . . . 100 ml

— Solution de thrombine :

Thrombine bovine	100 u.M.
Tampon phosphate *p*H 7,4 q.s.p. . . .	20 ml

Technique :

Introduire successivement dans la cuve de l'appareil :

Solution de fibrinogène.	0,25 ml
Solution de thrombine	0,10 ml

Mettre en marche l'appareil immédiatement après addition de la thrombine ; déclencher en même temps l'enregistrement et attendre le temps nécessaire à la stabilisation de l'amplitude. La durée de l'enregistrement du tracé devra être au minimum de 45 minutes. Développer alors le papier photographique.

2. **Etude de la reproductibilité du tracé.**

Deux séries de 5 tracés ont été obtenues à partir de 2 solutions de fibrinogène bovin du même lot.

Les résultats obtenus nous ont permis de calculer les valeurs moyennes et la déviation standard (*) de l'amplitude *am*, de l'angle α pour chacune de ces 2 séries de mesures. Ces résultats sont rassemblés au *tableau XXIII*.

TABLEAU XXIII

DISPERSION DES VALEURS DES CONSTANTES α ET *am* DU TRACÉ SUR DEUX SOLUTIONS DE FRIBINOGÈNE BOVIN DU MÊME LOT (0,50 pour 100 de protéines coagulables).

Séries	Angle α (degrés)	*am* (mm)
1	70 ± 0,85	27 ± 1,3
2	70 ± 0,85	26 ± 1,1

(*) Ecart quadratique moyen ou écart type ou déviation standard [545].

$$\sqrt{\frac{\Sigma\, d^2}{n-1}}$$

Cet essai permet de constater que, dans les conditions expérimentales décrites, la variabilité des mesures est faible et négligeable.

II. — ÉTUDE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE DE LA LYSE DU CAILLOT DE FIBRINE

Ayant déterminé précédemment les conditions d'obtention d'un tracé de fibrino-formation reproductible, nous nous proposons d'étudier dans cette seconde partie les modifications de ce tracé au cours de la fibrinolyse. Différents auteurs ont déjà consacré des travaux à la mesure de la lyse d'un caillot de fibrine (obtenue à partir d'une solution pure de fibrinogène) par thrombo-élastographie (*tableau* XXIV).

Toutefois, la technique précédemment décrite, bien que réunissant les conditions optimales de coagulation du fibrinogène, ne correspond pas, tout au moins en ce qui concerne le *p*H, aux conditions optimales de la fibrinolyse. C'est pourquoi nous décrivons tout d'abord les modifications apportées à cette technique en vue de son application à l'étude thrombo-élastographique de la lyse du caillot de fibrine.

A. — MODIFICATION A APPORTER A LA TECHNIQUE PRÉCÉDENTE EN VUE DE L'ÉTUDE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE DE LA LYSE DU CAILLOT

Différents auteurs [113], [408], [453] ont montré que le *p*H optimum d'activité de la plasmine est *p*H 8,0. Il ne coïncide pas avec le *p*H optimum de coagulation [77]. De façon à déterminer dans quelle mesure les variations de *p*H sont susceptibles de modifier le tracé, nous avons procédé à une étude systématique, à différents *p*H compris entre 6,5 et 9,5, de la lyse d'un caillot de fibrine, en présence d'une dose constante de plasmine.

TABLEAU XXIV

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES PRINCIPAUX TRAVAUX CONSACRÉS A LA MESURE DE LA LYSE D'UN CAILLOT DE FIBRINE PAR THROMBO-ÉLASTOGRAPHIE (*)

Principe		Constante retenue	Auteurs
Fibrinolyse induite par la plasmine ou par des activateurs du système fibrinolytique (urokinase, streptokinase).		Temps de lyse Amplitude Temps de lyse Temps de lyse Temps de lyse	ASTRUP et coll. (1950) [28]. CACCIOLA et coll. (1960) [91]. BLATT et coll. (1964) [61]. ASTRUP, EGEBLAD (1965) [29]. MIGNE et coll. (1966) [385].
Inhibition de la fibrinolyse	– Inhibiteurs plasmatiques (antiactivateurs, antiplasmines)	Surface de lyse Temps de lyse	BERTRAND et coll. (1965) [55]. EGEBLAD, ASTRUP (1967) [160].
	– Inhibiteurs de la plasmine (inhibiteurs de protéases) et de l'activation du plasminogène (EACA) (**)	Temps de lyse	EGEBLAD (1967) [159].

(*) Tableau limité à l'étude des mécanismes du système fibrinolytique in vitro excluant les fibrinolyses pathologiques et les thrombolyses expérimentales.

(**) EACA = Acide ε-amino-caproïque.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin Armour :

Fibrinogène Armour, quantité correspondant à 0,8 g de protéines coagulables (*).		
Tampon phosphate (*p*H différents) q.s.p.	100	ml

— Solutions de plasmine :

Plasmine purifiée d'origine porcine (Novo).	6,25	ml
Tampon phosphate (*p*H différents) q.s.p.	10	ml

— Solution de thrombine :

Thrombine bovine.	100	u.M.
Tampon phosphate (*p*H différents) q.s.p.	20	ml

Technique :

Sont introduits successivement dans la cuve de l'appareil pour chaque *p*H étudié :

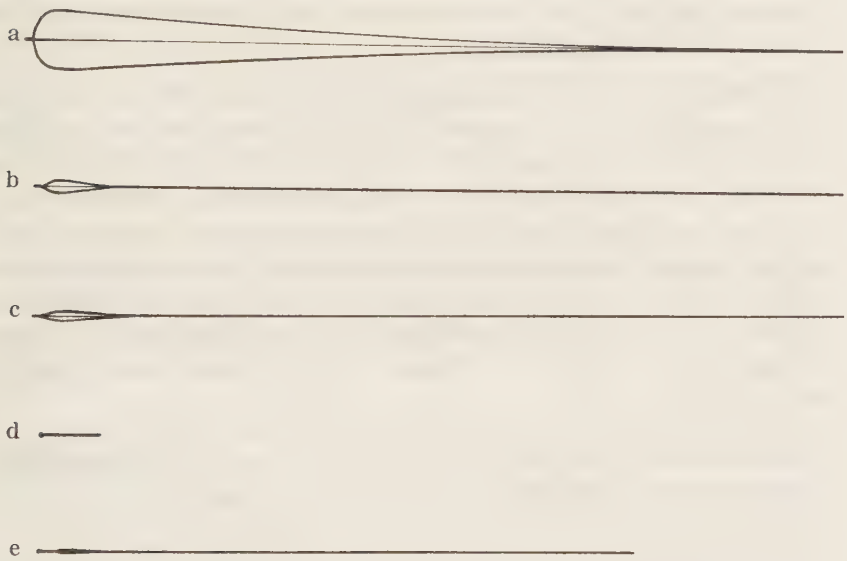
Solution de fibrinogène.	0,15	ml
Solution de plasmine.	0,10	ml
Solution de thrombine	0,10	ml

La thrombine est introduite dans la cuve immédiatement après la plasmine et l'enregistrement déclenché aussitôt. Les différents *p*H étudiés varient entre 6,5 et 9,5.

(*) En raison de la nécessité d'ajouter au milieu les enzymes fibrinolytiques sous un volume de 0,10 ml sans par ailleurs modifier le volume final de la cuve soit 0,35 ml, il était nécessaire d'introduire le fibrinogène sous un volume inférieur (0,15 ml) à celui utilisé précédemment (0,25 ml). Pour cette raison et de façon à utiliser la même dose de fibrinogène, nous avons préparé une solution plus concentrée (soit 0,8 pour 100 en protéines coagulables au lieu de 0,5 pour 100) de façon à l'introduire dans la cuve sous un volume de 0,15 ml. Dans ce cas particulier, le produit utilisé étant à 52 pour 100 de protéines coagulables, la solution de fibrinogène préparée est à 1,6 pour 100.

Résultats.

Les résultats obtenus sont représentés par les tracés correspondants (*figure* 23). Ces tracés montrent que le *p*H optimum d'action de la plasmine se situe entre 8 et 9. A *p*H 7,4 — *p*H optimum de la fibrino-formation — la lyse est donc moins intense qu'à *p*H 8. C'est pourquoi il paraît indispensable d'opérer pour les mesures thrombo-élastographiques de la lyse du caillot, à un *p*H compris entre 8 et 8,50.



Tracé a : *p*H 7,50.
Tracé b : *p*H 7,75.
Tracé c : *p*H 8,00.
Tracé d : *p*H 8,25.
Tracé e : *p*H 8,50.

Fig. 23. — Variation du tracé en fonction du *p*H.

Il faut souligner que ces résultats ne permettent pas de déterminer le *p*H optimum exact de la réaction de lyse, si l'on en juge par les variations de la coagulation elle-même aux divers *p*H (*cf. figures* 21 *et* 22).

B. — ÉTUDE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE DE L'ACTION FIBRINOLYTIQUE DE LA PLASMINE

Dans le but de différencier l'action protéolytique de la plasmine sur le fibrinogène (fibrinogénolyse) et sur la fibrine (fibrinolyse), nous avons étudié l'action de la plasmine soit en coagulant immédiatement après l'addition de l'enzyme, soit en respectant un temps d'incubation préalable susceptible de favoriser la digestion partielle du fibrinogène.

1. Effet fibrinolytique de la plasmine, sans incubation préalable. Lyse du caillot de fibrine.

Il existe différentes préparations commerciales de plasmine correspondant à un enzyme d'origine humaine ou porcine. Il nous a paru intéressant de comparer l'effet de ces préparations sur le tracé de la fibrinolyse. Ces préparations diffèrent entre elles non seulement par leur origine mais encore par leur mode de préparation. La fibrinolysine humaine est en réalité un plasminogène activé riche en streptokinase alors que la lysofibrine porcine est une plasmine purifiée. L'action de ces deux produits sur la lyse du caillot de fibrine a été étudiée au thrombo-élastographe.

Plasminogène d'origine humaine activé par la streptokinase (« fibrinolysine » Merck).

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin Poviet à 0,8 pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution-mère de fibrinolysine Merck (12,5 mg/ml) :

Fibrinolysine.	125 mg
Tampon phosphate *p*H 8,0 q.s.p.	10 ml

— Dilutions de la solution de plasmine *(cf. page 81)*.

— Solution de thrombine bovine à 5 u.M. par ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

Solution-mère (ml)	5	3,3	2,5	1,25	1
Tampon phosphate *p*H 8,0	← q.s.p. 10 ml →				
Conc. finale en µg/ml	6250	4166	3125	1562	1250

Solution-mère (ml)	5	2,5	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Tampon phosphate *p*H 8,0	← q.s.p. 100 ml →							
Conc. finale en µg/ml	625	312,5	115	112,5	100	87,5	75	62,5

Technique :

Sont introduites successivement dans la cuve la solution de fibrinogène (0,15 ml) puis la solution de plasmine (0,10 ml) et immédiatement après la solution de thrombine (0,10 ml). L'enregistrement est déclenché aussitôt.

Résultats.

L'examen de l'ensemble des tracés obtenus montre une augmentation très nette de l'activité lytique avec la dose de plasmine. L'analyse de ces tracés met tout d'abord en évidence une variation des constantes de coagulation α et *am* en fonction de la dose de plasmine (*figure* 24). Par ailleurs, ces tracés (*figure* 25) permettent de distinguer deux autres paramètres qui semblent objectiver l'action lytique de la plasmine.

Ces deux paramètres sont :

1. Le temps de lyse Tl thrombo-élastographique : distance en mm entre l'origine du tracé et le point de l'axe correspondant à la rencontre des deux branches du tracé. Comme ce point est parfois difficile à déterminer, nous avons choisi le point de l'axe correspondant à un écartement des branches de 2 mm (point de convergence T).

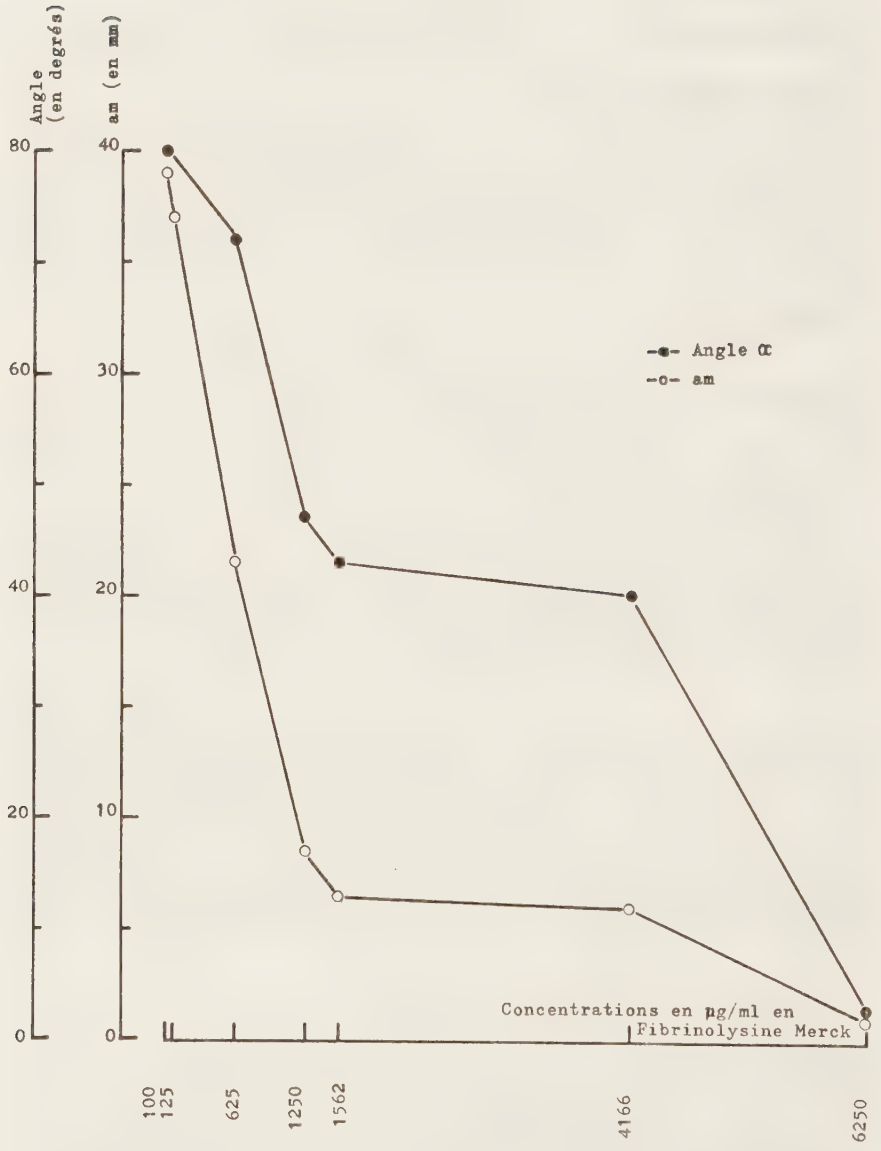
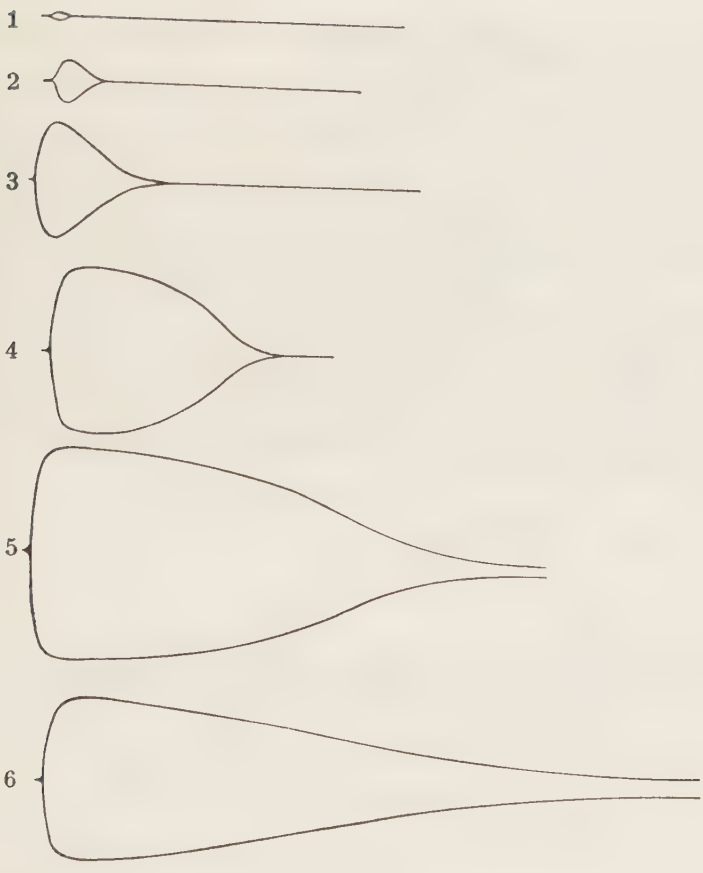


FIG. 24. — Variations de α et *am* en fonction de la concentration en fibrinolysine Merck.



1 = 12 500 µg/ml en fibrinolysine Merck.
2 = 1 250 µg/ml en fibrinolysine Merck.
3 = 625 µg/ml en fibrinolysine Merck.
4 = 125 µg/ml en fibrinolysine Merck.
5 = 100 µg/ml en fibrinolysine Merck.
6 = 62,5 µg/ml en fibrinolysine Merck.

Fig. 25. — Tracés de lyse obtenus avec la « Fibrinolysine Merck ».

2. La tangente de l'angle de lyse. Nous avions pensé pouvoir construire l'angle de lyse en traçant à partir du point de convergence du tracé T l'angle ayant pour côtés d'une part l'axe et

d'autre part la tangente géométrique à la courbe formée par une des branches du tracé.

Cet angle varie en fonction de la lyse du caillot. Mais sa mesure paraît difficile pour certains tracés. C'est pourquoi nous nous sommes tourné vers une mesure de tangente d'angle de lyse. Les mêmes difficultés de construction de la tangente de l'angle de lyse se sont présentées à nous. Nous avons alors adopté un schéma de construction d'un angle de lyse, assez peu modifié par rapport à la définition précédente mais dont la tangente trigonométrique était très simple à calculer. A cet effet, l'axe horizontal médian du tracé est construit puis la perpendiculaire à cet axe, passant par les points d'amplitude maxima, et enfin le point T (point de l'axe correspondant à un écartement maximum des branches de 2 mm).

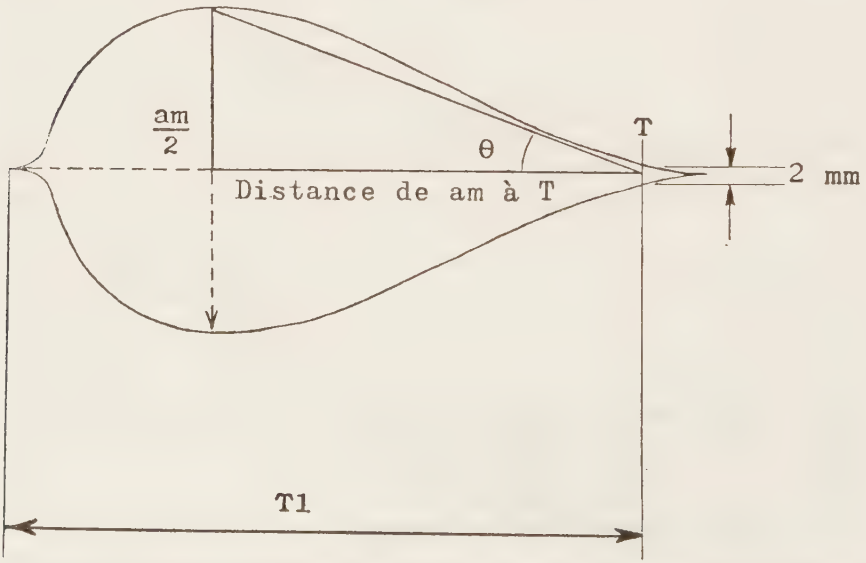


FIG. 26. — *Schéma des constantes de lyse adoptées.* Tangente de l'angle de lyse θ et temps de lyse Tl.

Nous avons appelé la valeur obtenue par le calcul ci-dessous tangente trigonométrique de l'angle de lyse ou tangente de l'angle Θ.

$$\text{tg } \Theta = \frac{\dfrac{\text{Amplitude maxima}}{2}}{\text{Distance de Am à T}}$$

La *figure* 27 montre que le temps de lyse régresse très rapidement lorsque la dose de plasmine augmente et atteint des valeurs qui diminuent ensuite beaucoup plus lentement pour une nouvelle augmentation de plasmine.

La *figure* 28 montre que cette variation du temps de lyse Tl est proportionnelle à la dose de plasmine entre certaines limites.

La *figure* 29 montre que la tg Θ augmente avec la dose de plasmine. Dans la même figure nous avons représenté les variations de tg α pour les mêmes tracés, de façon à montrer que les valeurs varient en sens inverse.

Plasmine purifiée d'origine porcine (*Lysofibrine Novo*).

Protocole.

Réactifs.

— Solution de fibrinogène bovin Poviet à 0,8 pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution-mère de « Lysofibrine » Novo (*) à 1 250 µg/ml :

Lysofibrine Novo	12,5	mg
Tampon phosphate *p*H 8,0 q.s.p.	10	ml

— Dilutions de la solution de plasmine.

Solution-mère (ml)	9	8	5	2,5
Tampon phosphate *p*H 8,0	1	2	5	7,5
Conc. finale en µg/ml	1125	1000	625	312,5

— Solution de thrombine bovine à 5 u.M. par ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

(*) Ce produit nous a été aimablement fourni par le Dr Samama, Laboratoire de l'Hémostase, Hôtel-Dieu, Paris.

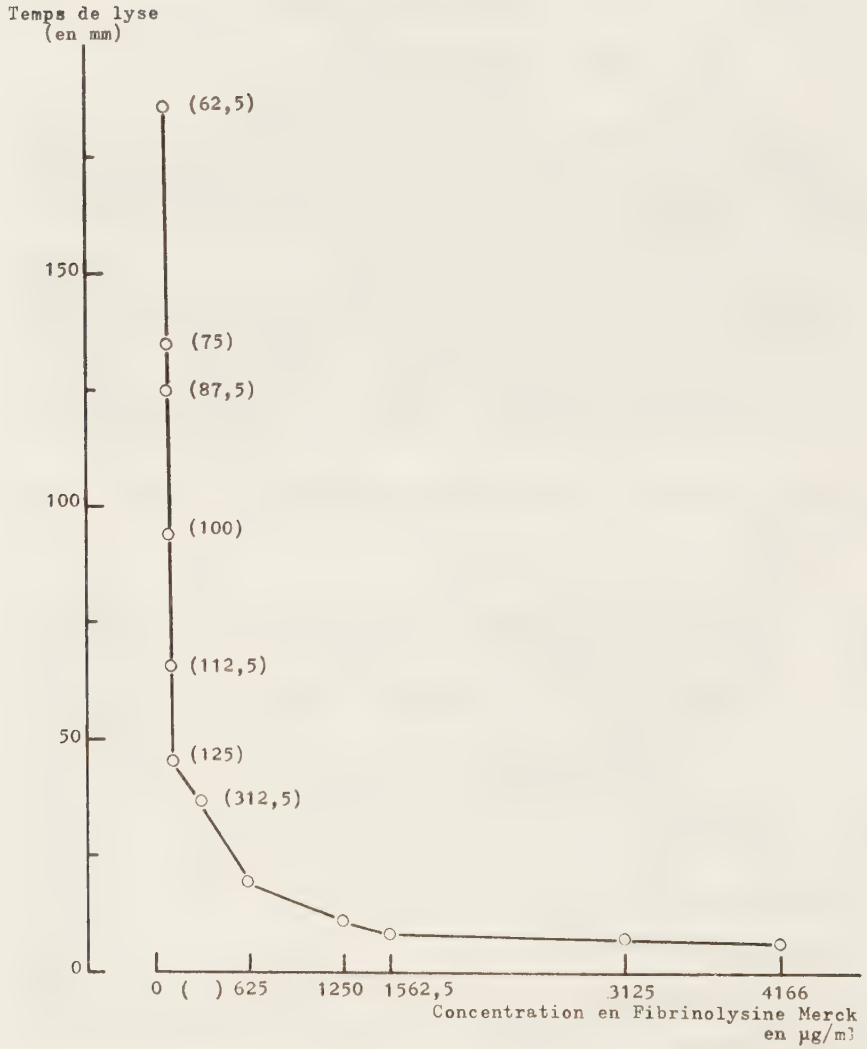


FIG. 27. — Variations du temps de lyse Tl en fonction de la concentration en fibrinolysine Merck.

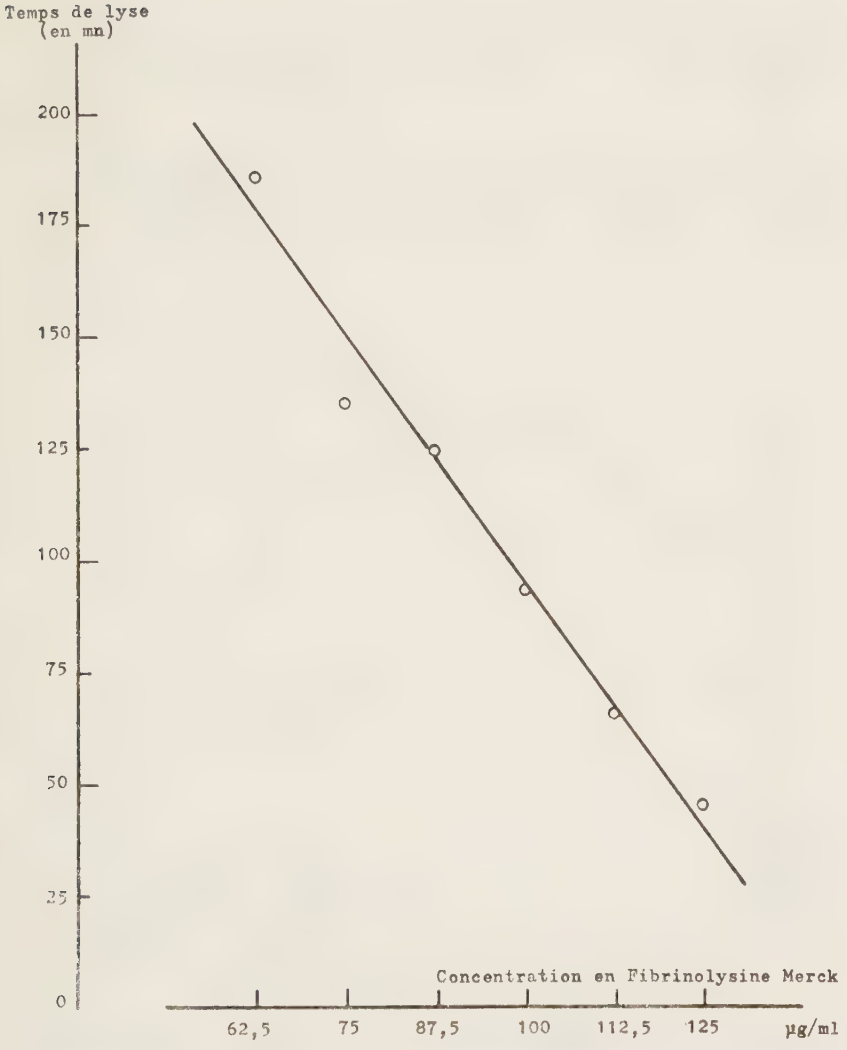


Fig. 28. — Variations linéaires du temps de lyse Tl en fonction de certaines concentrations en fibrinolysine Merck.

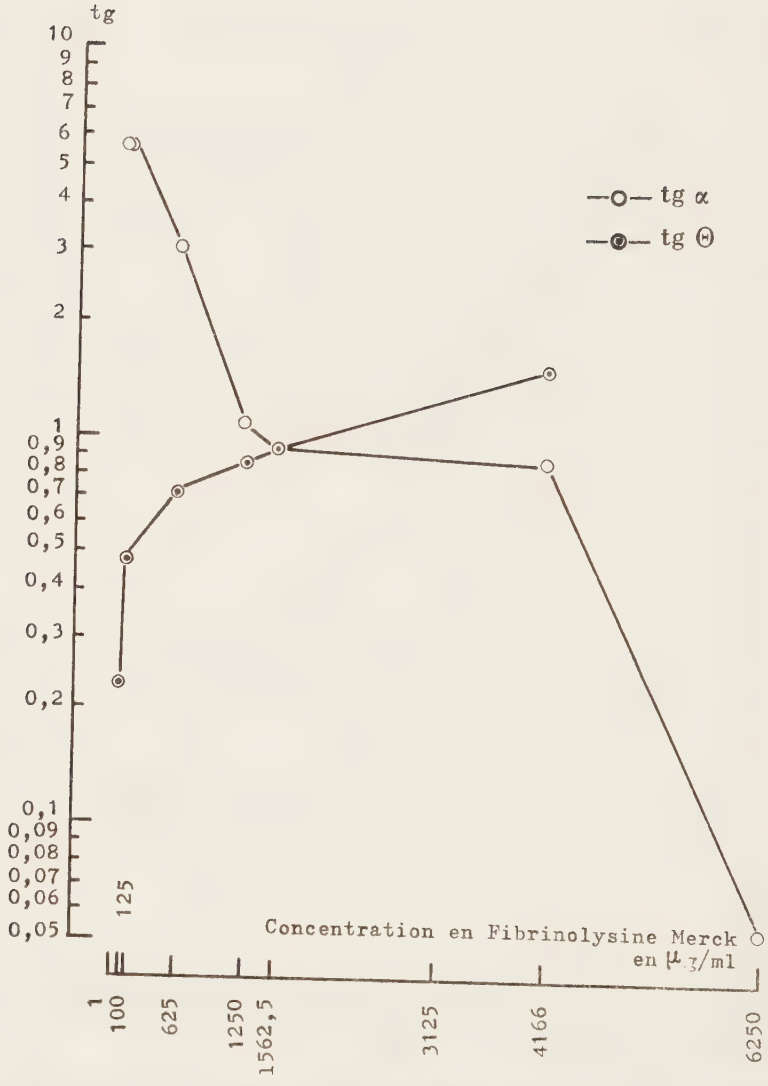


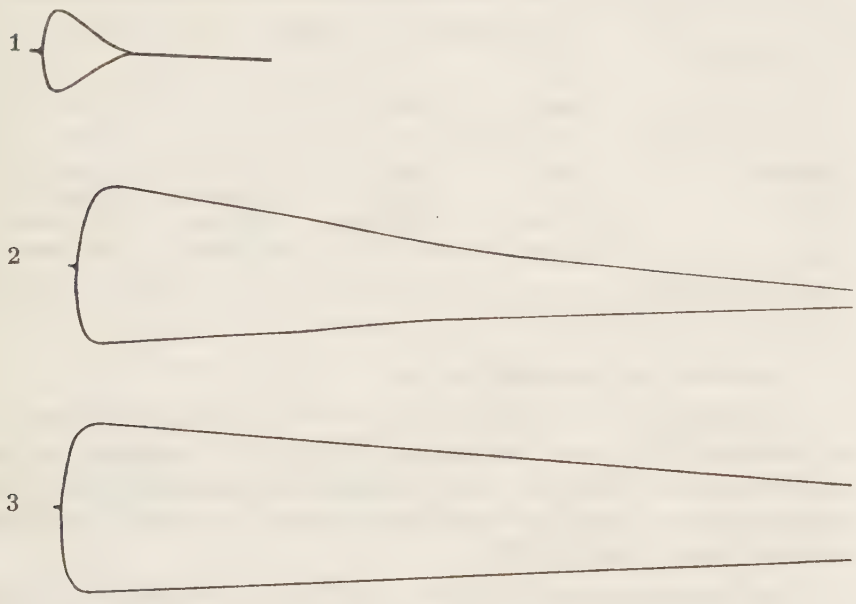
FIG. 29. — Variations des tangentes α et Θ en fonction de la concentration en fibrinolysine Merck.

Technique :

Le mode opératoire est le même que pour la plasmine Merck (cf. paragraphe précédent).

Résultats.

Nous étudierons successivement sur les tracés obtenus (*figure* 30) les variations des constantes de coagulation et de lyse.



1 = 1,250 mg/ml en lysofibrine Novo.
2 = 1,125 mg en lysofibrine Novo.
1 = 1 mg en lysofibrine Novo.

Fig. 30. — Tracés de lyse obtenus avec la « Lysofibrine Novo ».

Variations des constantes de coagulation α, tg α, r et am.

Le *tableau* XXV montre les variations de ces différents paramètres en fonction des doses de plasmine.

L'angle α et *am* varient dans le même sens. La diminution de l'angle semble indiquer une diminution de l'activité thrombinique

disponible dans le milieu. Ceci est confirmé par l'allongement de la constante *r* lorsque l'angle α diminue.

TABLEAU XXV

VARIATIONS DES PARAMÈTRES α, tg α, *r* et *am* EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN LYSOFIBRINE NOVO

Constantes	Concentrations en plasmine Novo (μg/ml)			
	625	1000	1125	1250
Angle α	80°	79°	77,5°	69°
tg α	5,671	5,144	4,510	2,605
r	1,0 mm	1,0 mm	1,0 mm	1,5 mm
am	26 mm	26 mm	24,5 mm	13,5 mm

Variations des constantes de lyse :

La diminution du temps de lyse pour des doses croissantes de plasmine Novo est très rapide. La *figure* 31 montre que la diminution du temps de lyse thrombo-élastographique (Tl) est proportionnelle dans un certain intervalle à la quantité de plasmine présente dans le milieu.

Les variations des tangentes α et Θ en fonction des doses croissantes de plasmine objectivent une diminution de l'angle de coagulation associée à une augmentation correspondante de l'angle de lyse (*figure* 32).

2. **Effet de la plasmine après incubation préalable avec le fibrinogène. Interférences entre fibrinogénolyse et fibrinolyse.**

Lorsque la plasmine est introduite dans une solution de fibrinogène, avant que celle-ci ne soit coagulée par la thrombine, il peut se produire dans le milieu une protéolyse plus précisément désignée sous le nom de fibrinogénolyse.

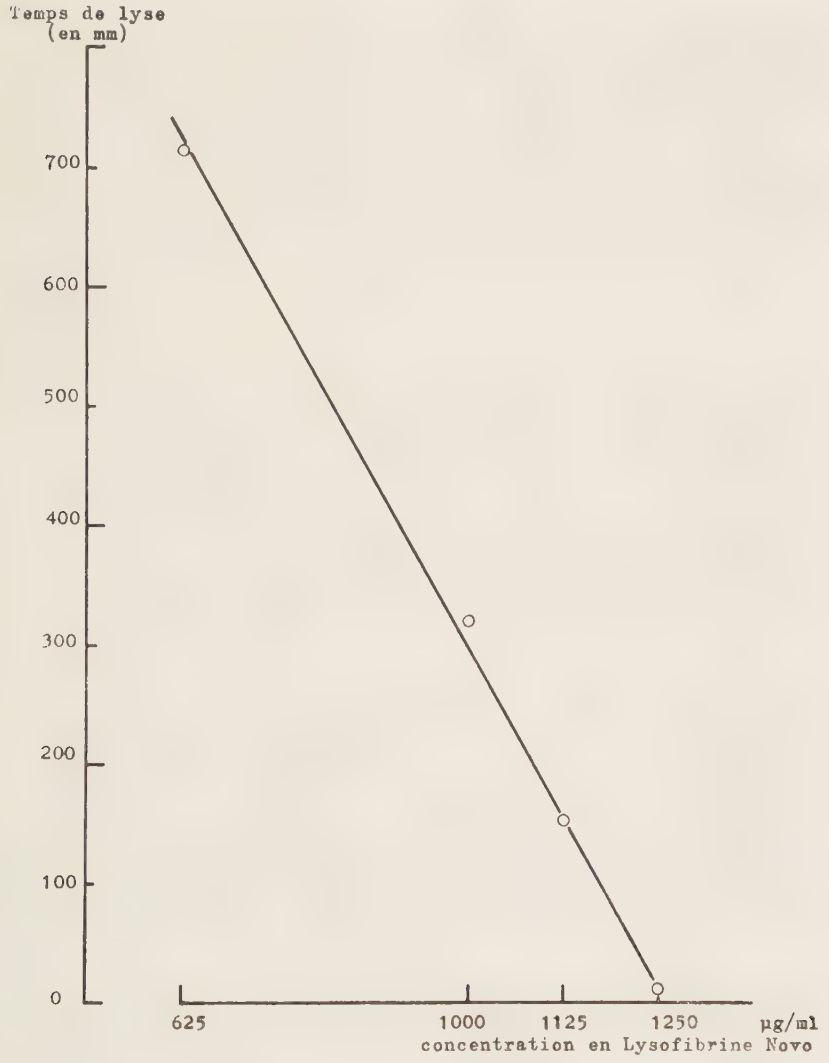


Fig. 31. — Variations du temps de lyse thrombo-élastographique (Tl) en fonction de la concentration en lysofibrine Novo.

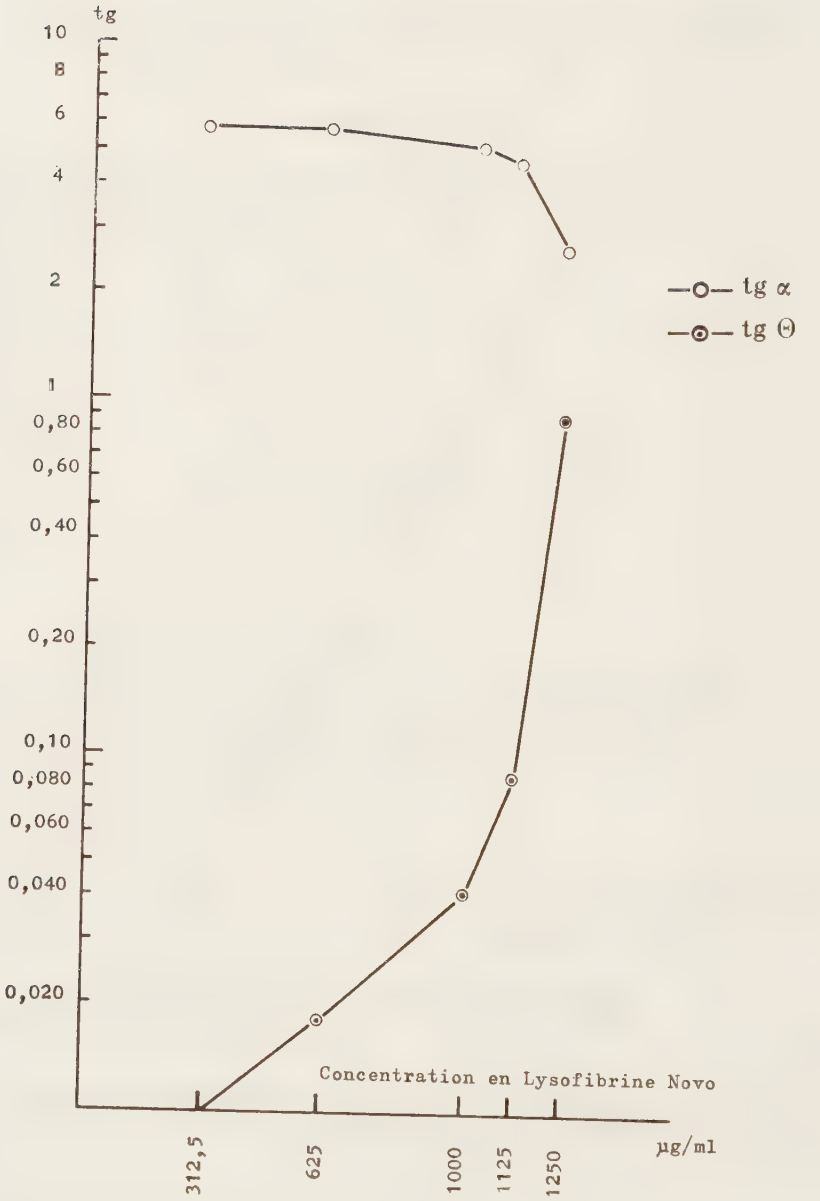


FIG. 32. — Variations des tangentes α et Θ en fonction de concentrations croissantes en lysofibrine Novo.

Dans le but de déterminer l'importance de ce phénomène, nous avons fait varier ce temps d'incubation de la plasmine dans la solution de fibrinogène, puis procédé à l'enregistrement du tracé de fibrino-formation par addition de thrombine. Ce tracé dépend, comme nous l'avons montré antérieurement, de la quantité de fibrinogène coagulable contenue dans le milieu et, dans le cas présent, cette quantité est elle-même dépendante de la fibrogénolyse.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin Poviet à 1,6 g pour 100 ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
(Ce fibrinogène contient 50,0 pour 100 de protéines coagulables p/p).

— Solution de « fibrinolysine » Merck d'origine humaine à 1,25 mg dans 100 ml de tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution de thrombine à 100 u.M. dans 20 ml de tampon phosphate *p*H 8,0.

Technique :

Dans la cuve de l'appareil, nous avons ajouté successivement :

Solution de fibrinogène . . . . . 0,15 ml
Solution de plasmine . . . . . 0,10 ml

Aussitôt après l'addition de plasmine, le chronomètre est déclenché et l'incubation maintenue pendant un temps déterminé. Au bout de ce temps la solution coagulante de thrombine est ajoutée au milieu sous un volume de 0,10 ml.

Résultats.

L'examen général des tracés obtenus montre une variation en fonction du temps d'incubation des constantes de coagulation *r*, α et *am*.

Temps de latence r :

Le temps de latence du tracé *r* s'allonge avec le temps d'incubation (*tableau* XXVI).

Angle α et *am* :

L'examen de la *figure* 33 montre que les constantes de coagulation α et *am* ne varient pas dans les mêmes proportions en fonction

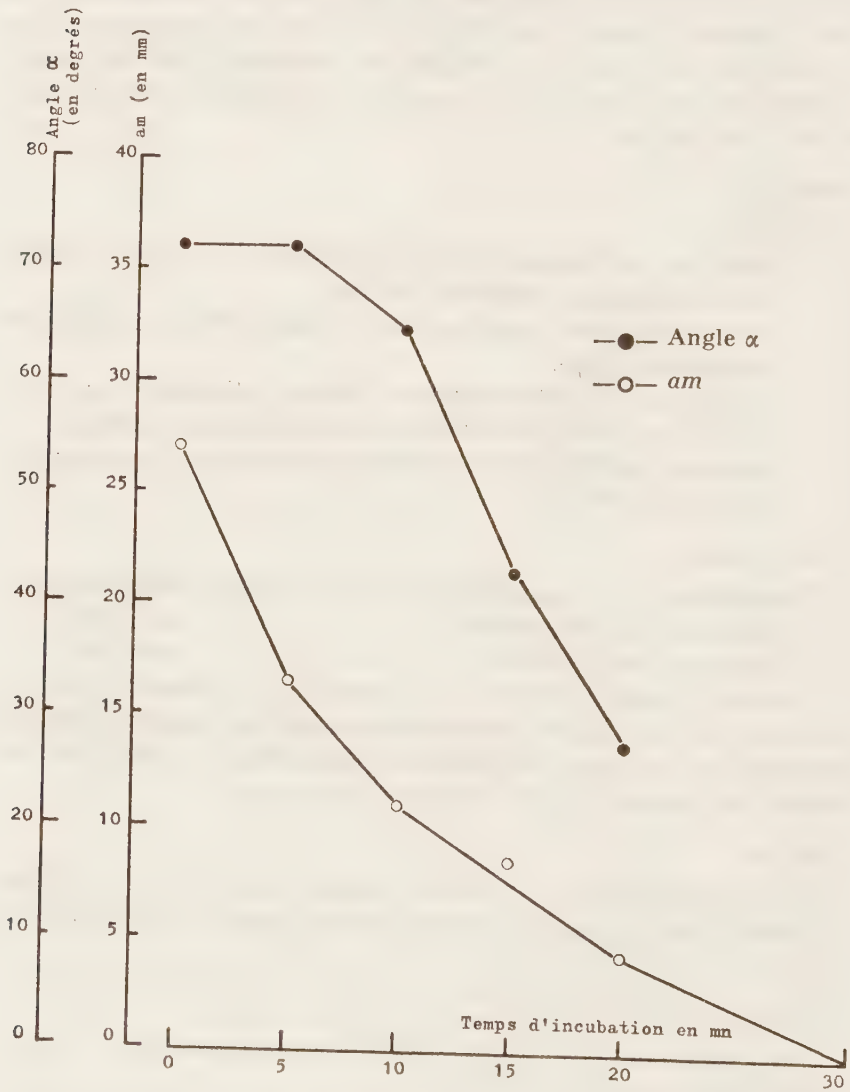


FIG. 33. — Variations de l'amplitude *am* et de l'angle α en fonction du temps d'incubation préalable de la plasmine dans la solution de fibrinogène.

du temps d'incubation. Alors que la plasmine provoque une décroissance immédiate et rapide de *am*, l'angle α varie très peu durant les 10 premières minutes et ne décroît que plus tardivement.

Ceci tend à montrer que, pour la concentration de plasmine utilisée, l'action de l'enzyme se manifeste par une diminution très rapide de la quantité de fibrinogène disponible. C'est seulement au-dessous d'une certaine concentration en fibrinogène que la vitesse de fibrino-formation est elle-même perturbée et entraîne une diminution de l'angle α.

TABLEAU XXVI

Temps d'incubation (en mn)	Temps de latence *r* (en mn)
0	1
5	1
10	1
15	1,5
20	1,5
30	∞

Variation des constantes de lyse :

La mesure des deux paramètres précédemment proposés pour caractériser les différents tracés de lyse, montre que le temps de lyse Tl et la tangente de l'angle Θ diminuent lorsque le temps d'incubation augmente (*figure* 34).

Ceci peut être attribuable au fait que la fibrinogénolyse a entraîné une diminution de la quantité de fibrine disponible après coagulation, modifiant ainsi le rapport des concentrations enzyme/substrat.

En résumé, la plasmine semble provoquer dans les conditions de l'expérience une protéolyse non négligeable du fibrinogène. Cette protéolyse qui croît avec le temps réduit d'autant la quantité de fibrine disponible après addition de thrombine.

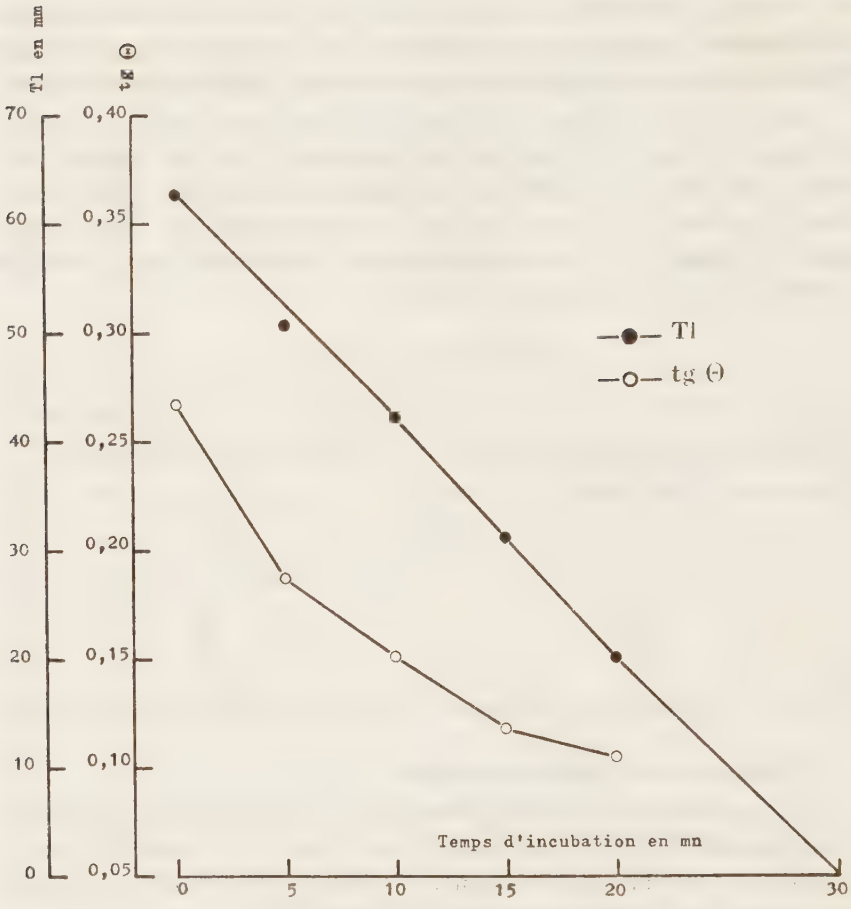


FIG. 34. — Variations du temps de lyse (Tl) et de l'angle de lyse (tg Θ) en fonction du temps d'incubation de la plasmine avec la solution de fibrinogène.

En définitive, il semble bien que le tracé thrombo-élastographique soit susceptible de différencier une fibrinogénolyse suivie de fibrinolyse d'une fibrinolyse simple.

La fibrinogénolyse et la fibrinolyse entraînent une diminution de l'amplitude maxima. Mais, alors que la fibrinolyse se traduit

par une augmentation de l'angle de lyse (et de tg Θ) en fonction de doses croissantes d'enzymes, la fibrinogénolyse provoque un phénomène inverse à savoir une diminution du même angle de lyse (et de tg Θ).

C. — ÉTUDE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE DE LA LYSE DU CAILLOT DE FIBRINE PAR ACTIVATION DU PLASMINOGÈNE

Au cours des précédents essais, nous avons étudié au thrombo-élastographe l'effet direct de la plasmine sur le fibrinogène et la fibrine. Cependant nous n'avons pas tenu compte du fait que toutes les préparations commerciales de fibrinogène bovin contiennent des quantités non négligeables de plasminogène. Nous nous proposons de démontrer au thrombo-élastographe l'existence du zymogène dans le fibrinogène bovin Armour utilisé au cours de ce travail, puis nous étudierons les conditions de purification de ce fibrinogène.

1. Mise en évidence de la présence de plasminogène dans les préparations commerciales de fibrinogène bovin et étude au thrombo-élastographe de l'activation par la streptokinase.

a) Mise en évidence de la présence de plasminogène à l'aide de streptokinase.

L'addition de streptokinase à une solution de fibrinogène bovin riche en plasminogène n'entraîne, après coagulation par la thrombine, aucune fibrinolyse [394], [408], [411]. En revanche, si cette solution contient une quantité extrêmement faible de plasma humain, cela suffit pour que la même dose de streptokinase provoque une lyse intense [394], [411]. L'addition de cette quantité minime de plasma humain apporte au milieu un proactivateur [113] indispensable pour que se manifeste l'action lytique de la streptokinase [411]. Le mécanisme d'action proposé par Muellertz et Lassen [411] est le suivant :

Streptokinase + proactivateur = activateur

activateur + plasminogène = plasmine

C'est dans de telles conditions que nous avons cherché à vérifier la présence de plasminogène dans quatre préparations commerciales de fibrinogène A, B, C ou D déjà citées au début de ce chapitre.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène A, B, C ou D (*) à 1,6 pour 100 dans le tampon phosphate *p*H 8,0 contenant 0,1 ml de plasma humain pour 10 ml de solution ;

— Solution de streptokinase à 2,5 unités Christensen par ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0 ;

— Solution de thrombine à 100 u.M. dans 20 ml de tampon phosphate *p*H 8,0.

Technique :

Pour chaque solution de fibrinogène, 0,15 ml sont prélevés et introduits dans une cuve de l'appareil. Ajouter ensuite dans l'ordre 0,10 ml de solution de streptokinase puis immédiatement après 0,10 ml de solution de thrombine. Déclencher alors l'enregistrement photographique du faisceau lumineux.

Résultats.

Les tracés obtenus présentent, pour les quatre préparations étudiées, l'allure de tracés de fibrinolyse. Nous donnons dans le *tableau* XXVII la quantité de protéines coagulables contenues dans 0,15 ml de chaque solution de fibrinogène et la valeur correspondante du temps de lyse. Ces résultats nous montrent bien que les quatre produits étudiés contiennent du plasminogène dans une proportion variable.

(*) Fibrinogène A : protéines coagulables (mg/ml de solution) 0,49.
Fibrinogène B : protéines coagulables (mg/ml de solution) 0,57.
Fibrigonène C : protéines coagulables (mg/ml de solution) 0,56.
Fibrinogène D : protéines coagulables (mg/ml de solution) 1,00.

b) Influence de la concentration en streptokinase sur la lyse du caillot de fibrine.

Dans le but d'analyser à l'aide du thrombo-élastographe le phénomène d'activation du plasminogène par la streptokinase,

TABLEAU XXVII

VARIATIONS DES TEMPS DE LYSE POUR DIFFÉRENTES SOLUTIONS UTILISÉES DE FIBRINOGÈNE BOVIN

Solution de fibrinogène	A	B	C	D
Taux de protéines coagulables en μg	1077,6	1365,6	1375,2	2400
Temps de lyse Tl (en mn)	30	46	39	80,5

nous avons fait varier pour une même préparation de fibrinogène (fibrinogène Armour) la concentration en streptokinase, cherchant ainsi, en présence de proactivateur plasmatique, à produire une activation de plus en plus marquée du plasminogène présent dans le milieu.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin A à 1,6 g pour 100 ml de tampon phosphate *p*H 8,0 contenant 1 ml de plasma humain.
— Solution-mère de streptokinase à 50 000 unités Christensen par ml (tampon phosphate *p*H 8,0).
— Dilutions préparées à partir de la solution-mère (*) 25 000 UCh/ml, 12 500 UCh/ml, 1 250 UCh/ml, 500 UCh/ml et 2,5 UCh/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
— Solution de thrombine à 100 u.M. dans 20 ml de tampon phosphate *p*H 8,0.

(*) UCh = unités Christensen.

Technique :

Le mode opératoire suivi est identique à celui décrit lors de l'étude précédente de l'addition de streptokinase à différentes préparations de fibrinogène.

Résultats.

L'augmentation de la concentration en streptokinase du milieu entraîne une modification importante des tracés thrombo-élastographiques.

Temps de lyse Tl :

Dans la *figure* 35 sont représentées les variations du temps de lyse en fonction de la concentration en streptokinase.

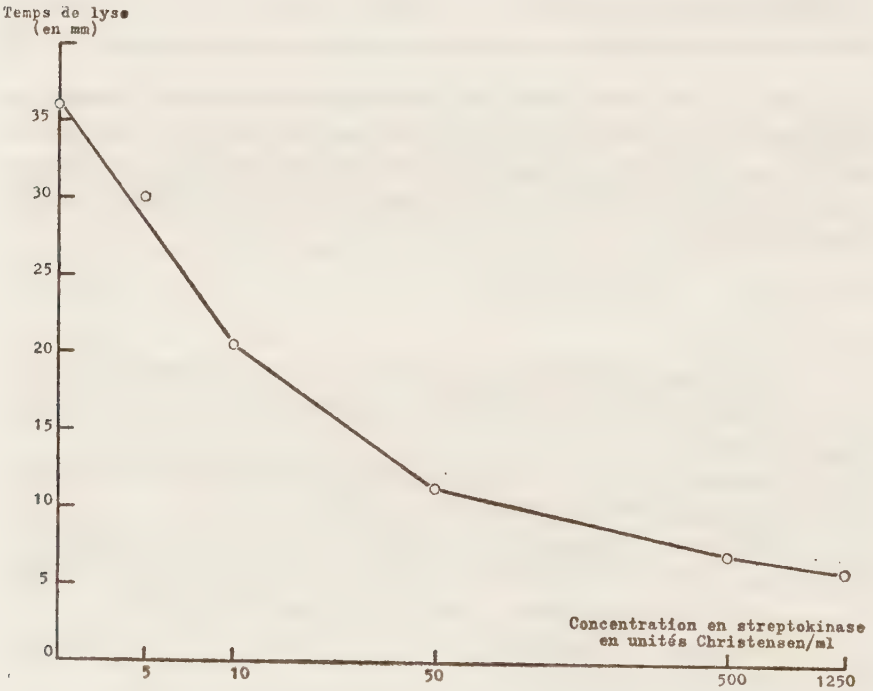


FIG. 35. — Variations des temps de lyse en fonction de concentrations croissantes en streptokinase.

Le temps de lyse et la concentration en streptokinase ne varient pas proportionnellement comme c'était le cas pour la plasmine purifiée d'origine porcine Novo (*cf figure* 31). En revanche, la courbe de la *figure* 35 se rapproche de celle obtenue avec la « fibrinolysine Merck » (*cf figure* 27), qui est une préparation de plasminogène humain activé par la streptokinase. Ceci fait ressortir la grande sensibilité du tracé thrombo-élastographique aux différentes préparations enzymatiques utilisées.

En outre, il faut remarquer que le temps de lyse thrombo-élastographique diminue progressivement lorsque la concentration en streptokinase augmente mais ceci jusqu'à une certaine limite, au-delà de laquelle se produit un effet inverse (*figure* 36). Ceci peut être attribuable, comme l'ont souligné différents auteurs [430], à un phénomène d'inhibition, par de fortes concentrations en streptokinase, de la fibrinolyse.

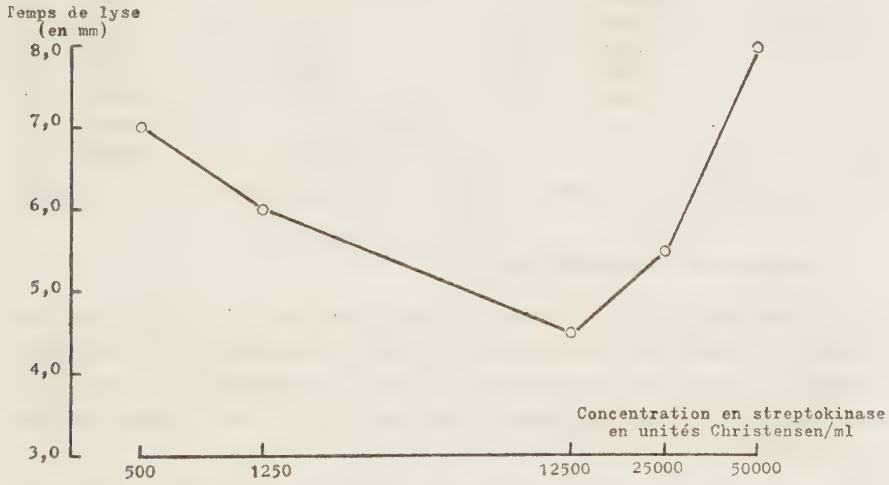


Fig. 36. — Variations des temps de lyse en fonction des concentrations croissantes en streptokinase.

Angles α et am :

Les angles α et *am* varient dans le même sens pour des concentrations croissantes en streptokinase. A la diminution de α et *am*

pour l'augmentation de ces concentrations, succède une augmentation de ces mêmes constantes thrombo-élastographiques lors de l'addition de très fortes concentrations en streptokinase. Le *tableau* XXVIII fait état de ces variations.

TABLEAU XXVIII

VARIATIONS DES PARAMÈTRES α *et am* EN FONCTION DE DOSES VARIABLES EN STREPTOKINASE

Conc. de la solution de streptokinase ajoutée en unités Christensen/ml	Angle α (degrés)	*am* (mm)
50 000	45	9,5
25 000	28,5	4
12 500	11,5	2,5
1 250	57,5	13
500	70	18,5
50	71	21
10	72	23,5
5	73	25,5
2,5	73,5	26,5

Tangente de l'angle de lyse Θ :

Le *tableau* XXIX montre que les variations de la tangente Θ sont à l'inverse des précédentes. En effet, la tangente de l'angle Θ augmente avec la concentration en streptokinase, passe par un maximum puis régresse pour de fortes concentrations en streptokinase.

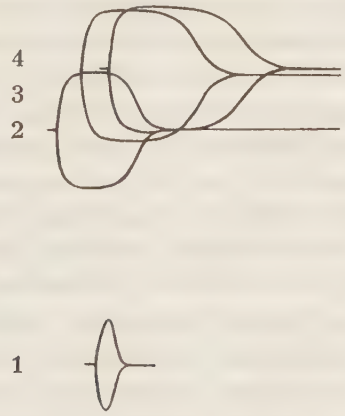
Il faut remarquer plus particulièrement que dans le cas de la streptokinase la valeur maxima de la tangente de l'angle de lyse (tg Θ) coïncide avec une valeur élevée presque maxima de α, alors que, dans le cas de la plasmine purifiée d'origine porcine (Novo), le maximum de tg Θ coïncide avec le minimum de l'angle α.

TABLEAU XXIX

Variations de la tangente de l'angle Θ en fonction de doses variables en streptokinase

Conc. de la solution de streptokinase ajoutée en unités Christensen/ml	Tangente de l'angle Θ
50 000	1,900
25 000	2,000
12 500	2,500
1 250	3,200
500	3,250
50	2,144
10	0,903
5	0,616
2,5	0,354

Dans la *figure* 37, nous avons représenté des tracés obtenus soit avec la streptokinase, soit avec la plasmine purifiée Novo. L'allure de ces tracés diffère sensiblement.



1 = 500 unités Christensen/ml.
2 = 10 unités Christensen/ml.
3 = 5 unités Christensen/ml.
4 = 2,5 unités Christensen/ml.

Fig. 37. — Tracés thrombo-élastographiques de lyse obtenue avec des concentrations variables en streptokinase.

D'une façon générale, pour des temps de lyse supérieurs à 10 minutes, c'est-à-dire ne modifiant presque pas l'amplitude maxima, les tracés obtenus par addition de streptokinase présentent sur une partie de leurs parcours des branches parallèles puis une incurvation brutale correspondant à la lyse. En revanche, les tracés obtenus par addition de plasmine purifiée Novo, d'origine porcine, présentent des branches convergentes, montrant une diminution progressive de l'amplitude jusqu'à la lyse.

Ceci pourrait résulter du fait que, lors de l'utilisation de la streptokinase, il existe un temps de latence correspondant à l'activation du plasminogène dans le milieu, alors que l'utilisation directe de la plasmine purifiée Novo donne une protéolyse qui commence avec la fibrino-formation.

2. Purification en vue de l'obtention d'un fibrinogène bovin exempt de plasminogène.

Comme nous venons de le voir, les préparations commerciales de fibrinogène bovin contiennent une quantité de plasminogène non négligeable puisque après activation par la streptokinase en présence de proactivateur humain, elles donnent spontanément des tracés bien caractéristiques de fibrinolyse.

Ceci constitue une cause d'erreur dans l'étude thrombo-élastographique de la fibrinolyse où, en l'absence d'un substrat pur, s'ajoutera à l'activité propre des enzymes étudiés, celle correspondant au plasminogène présent dans le milieu. Ce plasminogène est, en effet, non seulement activable par la streptokinase ou l'urokinase, mais par la plasmine elle-même [8], [32].

Il serait donc en principe nécessaire, pour déterminer de façon précise la correspondance réelle entre la mesure thrombo-élastographique et la mesure chimique de la fibrinolyse, de disposer d'un substrat purifié, exempt de plasminogène.

a) Différents procédés de purification du fibrinogène.

Plusieurs méthodes de purification de la fraction I de Cohn ont été proposées en vue de l'obtention d'un fibrinogène exempt

de plasminogène, et contenant un taux aussi élevé que possible en protéines coagulables.

Ces méthodes sont schématiquement rassemblées dans le *tableau récapitulatif* XXX.

Parmi ces méthodes, celles qui semblent, en fonction des résultats obtenus par leurs auteurs, conduire à un produit totalement exempt de plasminogène sont la méthode de purification sur Séphadex [52] et la méthode de Mosesson (précipitation par l'éthanol en présence de lysine) [402].

Nous avons utilisé successivement l'une et l'autre de ces deux méthodes. Le fibrinogène obtenu est, dans chaque cas, soumis aux contrôles suivants :

— Dosage des protéines totales (méthode du biuret).

— Dosage des protéines coagulables (voir plus loin méthode de Leclerc).

— Recherche de la lyse spontanée du caillot de fibrine après addition d'activateur du plasminogène.

b) Purification sur Séphadex :

Nous avons suivi intégralement la technique de Berg et coll. utilisant un Séphadex G 200. A partir de 100 mg de fibrinogène bovin Armour (contenant 48 pour 100 de protéines coagulables) cette technique nous a permis de séparer deux fractions principales présentant à 280 mμ le maximum d'absorption des protéines.

La première de ces fractions correspond à 21 mg de protéines (rendement 43,8 pour 100). La solution est coagulable par la thrombine et résiste totalement à l'action des activateurs de la lyse. Le dosage des protéines coagulables donne une valeur égale au dosage des protéines totales montrant que le produit est du fibrinogène de pureté pratiquement égale à 100 pour 100.

La seconde fraction n'est pas coagulable par la thrombine. Ce produit est, comme le plasminogène, activable par la streptokinase ou l'urokinase et présente une activité protéolytique équivalente au total à 0,6 unité caséinolytique (méthode décrite dans la seconde partie du chapitre).

TABLEAU XXX

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES PRINCIPALES MÉTHODES DE PURIFICATION DU FIBRINOGÈNE.

Principe	Technique		Auteurs
Précipitation directe du fibrinogène dans la solution à purifier (augmentation de la solubilité du plasminogène)	Précipitation par solvant organique dans une solution fortement concentrée en amino-acide	Ethanol et glycine Ethanol, glycine et lysine Ethanol et lysine	BLOMBAECK et BLOMBAECK (1956) [69]. BERGSTROM et WALLEN (1961) [54]. MOSESSON (1962) [402].
Elimination par précipitation plasminogène à *p*H 6,4 et sous faible force ionique, puis précipitation du fibrinogène	Précipitation par sels minéraux Précipitation par solvant organique Précipitation par des sels minéraux en présence d'amino-acide	Sulfate d'ammonium Ether Sulfate d'ammonium glycine et EACA	LAKI (1951) [305]. KEKWICK (1955) [278]. JOHNSON et coll. (1955) [266].
Séparation par chromatographie du fibrinogène et du plasminogène		Cellulose DEAE cellulose Gel phosphate Ca Séphadex G 200	GODAL, LUSCHER (1960) [201]. FINLAYSON et MOSESSON (1963) [179]. CELANDER et GUEST (1960) [102], [103]. BERG et KORSAN-BENGSTEN (1963) [52].

Cette méthode nous a donc permis d'obtenir un fibrinogène pur et exempt de plasminogène. Toutefois, elle constitue une méthode longue, limitée à la purification de faibles quantités de fibrinogène.

c) Purification selon la méthode de Mosesson [402].

Cette méthode est basée sur le fait que, en présence de lysine, la solubilité du plasminogène est accrue au point de ne plus être précipitable par l'éthanol. Dans ces conditions, il devient impossible de séparer le fibrinogène du plasminogène présent dans le milieu.

Suivant la technique de Mosesson, nous avons procédé à 2 essais consécutifs à partir de 5 g pour chaque essai, de fibrinogène bovin Armour. Les quantités de fibrinogène pur obtenues sont :

1re essai : 1,27 g
2e essai : 0,860 g

Si l'on considère que le produit de départ contient 45 pour 100 de protéines coagulables, les rendements respectifs de ces purifications sont :

1er essai : 56 pour 100
2e essai : 38 pour 100

Les produits obtenus ont été contrôlés par dosage des protéines totales (méthode du biuret) et des protéines coagulables (méthode de Leclerc). Ces méthodes seront décrites plus loin.

Les résultats montrent que le fibrinogène obtenu à la suite de ces purifications contient 100 pour 100 de protéines coagulables par la thrombine. L'absence de plasminogène a été vérifiée après coagulation par la thrombine, par comparaison avec le fibrinogène de départ (lyse spontanée du caillot après addition des activateurs). Alors que le fibrinogène non purifié subit une protéolyse rapide, les produits purifiés obtenus donnent un caillot stable dans ces conditions.

L'essai de résistance à la lyse est déterminé de la façon suivante. Nous ajoutons dans un tube à essai successivement :

- 0,25 ml de solution de fibrinogène à 0,4 pour 100 de protéines coagulables (*contenant* 1 *pour* 100 *en volume de plasma humain*).
- 0,1 ml de solution de streptokinase à 50 UCh/ml.
- 0,1 ml de solution de thrombine à 10 u.M./ml.

Dans ces conditions, le fibrinogène Armour lyse en moins de 30 minutes. Le fibrinogène purifié, préparé selon la technique de Mosesson, ne présente en revanche qu'un léger début de lyse au bout de 22 heures et n'est pas totalement lysé en 24 heures.

3. Etude thrombo-élastographique de la lyse du caillot de fibrine préparé à partir du fibrinogène purifié exempt de plasminogène.

La purification du fibrinogène nous a permis, par la méthode de Mosesson, d'obtenir, en quantité suffisante, un produit pur coagulable par la thrombine et exempt de plasminogène.

Ce produit donne au thrombo-élastographe un tracé dont les constantes sont pratiquement identiques à celles obtenues avec une quantité égale de fibrinogène non purifié.

Il constitue donc un substrat de fibrino-formation très comparable à celui que nous avions utilisé jusqu'à présent. Nous nous proposons de déterminer dans quelle mesure sa purification a entraîné une modification des tracés de lyse.

A cet effet, nous avons étudié l'influence de concentrations variables en « fibrinolysine » Merck d'une part et en « lysofibrine » Novo d'autre part. Rappelons que la première est une préparation de plasminogène humain activé par la streptokinase, alors que la seconde est une préparation de plasmine porcine purifiée.

Cet essai a été pratiqué simultanément, dans des conditions aussi voisines que possible, avec le fibrinogène purifié d'une part, et avec le fibrinogène Armour ayant servi à le préparer d'autre part.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène :

Fibrinogène Armour
Fibrinogène purifié
} Quantité correspondant à 4 mg de protéines coagulables par ml de solution dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution de thrombine :

5 u.M./ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution de plasmine :

Fibrinolysine Merck.

Solution-mère à 12,5 mg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

Dilutions de la solution-mère.

Dilutions	1/2	1/5	1/10	1/50	1/400
Conc. finale en µg/ml	6250	2500	1250	250	31,25

Lysofibrine Novo.

Solution-mère à 1 mg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

Dilutions de la solution-mère.

Dilutions	9/10	8/10	7/10	6/10	5/10	3/10	2/10	1/10
Conc. finale en mg/ml	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,3	0,2	0,1

Technique :

Sont introduits dans la cuve du thrombo-élastographe :

0,15 ml de solution de fibrinogène,

0,10 ml de solution de « fibrinolysine » ou de « lysofibrine », puis aussitôt après :

0,10 ml de solution de thrombine.

L'enregistrement est déclenché immédiatement après addition de la thrombine.

Résultats.

1. Fibrinolysine Merck.

Les résultats obtenus montrent que la sensibilité à la « fibrinolysine » des deux préparations de fibrinogène utilisées diffère notablement.

En effet, pour de faibles concentrations en fibrinolysine (31,25 µg/ml et 250 µg/ml), le fibrinogène purifié ne lyse pas (tracé à branches parallèles), alors que le fibrinogène Armour non purifié présente un tracé de lyse caractéristique.

Les courbes de variation du temps de lyse thrombo-élastographique en fonction des concentrations en « fibrinolysine » (*figure* 38) montrent que pour le fibrinogène purifié la lyse ne peut être obtenue qu'avec des concentrations supérieures à 1 250 µg/ml alors que le fibrinogène Armour est sensible à des concentrations variant de 31 à 1 250 µg/ml. Cette différence semble devoir être attribuée à l'activation du plasminogène présent dans le fibrinogène Armour.

En dehors de cette différence de sensibilité, apparaît, pour des concentrations élevées en « fibrinolysine », une différence dans l'allure même des tracés (*figure* 39). Nous retrouvons en effet sur le fibrinogène Armour non purifié ce que nous avions obtenu (*cf. figure* 37), à savoir une coïncidence entre les valeurs maxima de l'angle de lyse (tg Θ) et de l'angle α (*cf. tableaux* XXXVIII *et* XXIX). En revanche, sur le fibrinogène purifié, les résultats obtenus se rapprochent plutôt de ceux obtenus avec une plasmine purifiée. Le maximum de tg Θ coïncide avec un minimum de l'angle α.

Il semble donc que, dans la lyse du fibrinogène Armour non purifié, prédominent les mécanismes d'activation du plasminogène par la streptokinase, alors que, sur le fibrinogène purifié, seule semble mise en cause l'action de la plasmine.

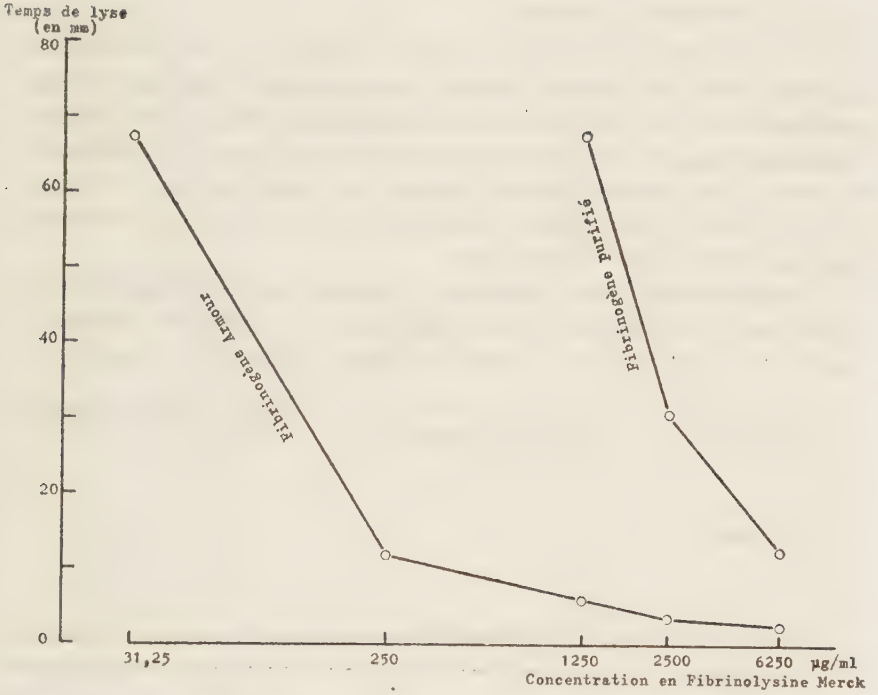
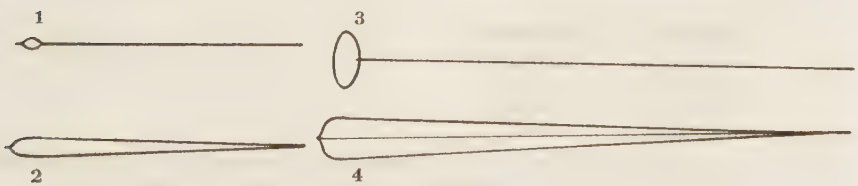


FIG. 38. — Variations du temps de lyse thrombo-élastographique en fonction des concentrations croissantes en fibrinolysine Merck.



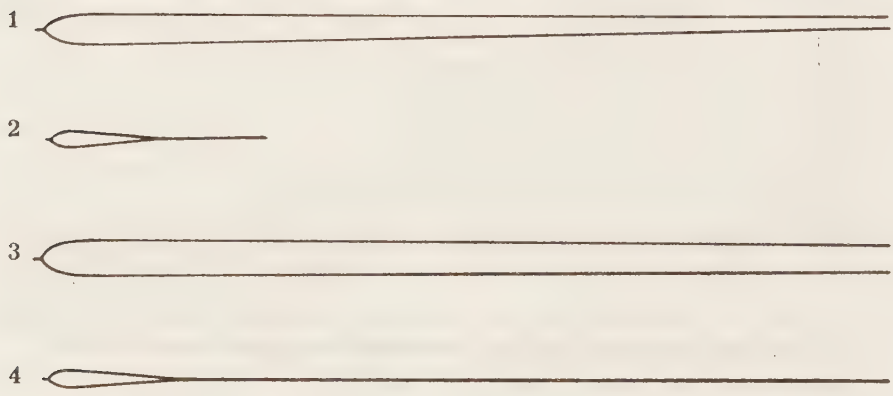
	Fibrinolysine	Fibrinogène
1	2 500 /g/ml	Armour
2	2 500 /g/ml	purifié
3	1 250 /g/ml	Armour
4	1 250 /g/ml	purifié

FIG. 39. — Tracés thrombo-élastographiques de coagulation du fibrinogène purifié et du fibrinogène Armour non purifié, en présence de fibrinolysine Merck.

2. « Lysofibrine » Novo.

Les résultats obtenus sont très différents des précédents. En effet, avec cet enzyme purifié, le fibrinogène Armour présente une sensibilité inférieure à celle du substrat débarrassé de plasminogène (*figure* 40). Pour une concentration en « lysofibrine » de 500 µg/ml, le fibrinogène Armour ne donne aucune lyse alors que le fibrinogène purifié présente un temps de lyse thrombo-élastographique de 6 minutes.

Contrairement aux résultats obtenus précédemment avec la fibrinolysine Merck, aucune différence ne peut être observée, quelle que soit la dose d'enzyme, dans l'allure des tracés.



	Lysofibrine	Fibrinogène
1	6 mg/ml	Armour
2	6 mg/ml	purifié
3	5 mg/ml	Armour
4	5 mg/ml	purifié

Fig. 40. — Tracés obtenus avec du fibrinogène Armour et du fibrinogène non purifié après addition de lysofibrine Novo.

Qu'il s'agisse de fibrinogène purifié ou non, les variations des angles de coagulation (α) et de lyse (tg Θ) sont opposées, ce qui est bien caractéristique des tracés thrombo-élastographiques de plasmine exempte de streptokinase. La *figure* 41 représente les variations du temps de lyse thrombo-élastographique en fonction de la concentration en « lysofibrine » Novo et montre

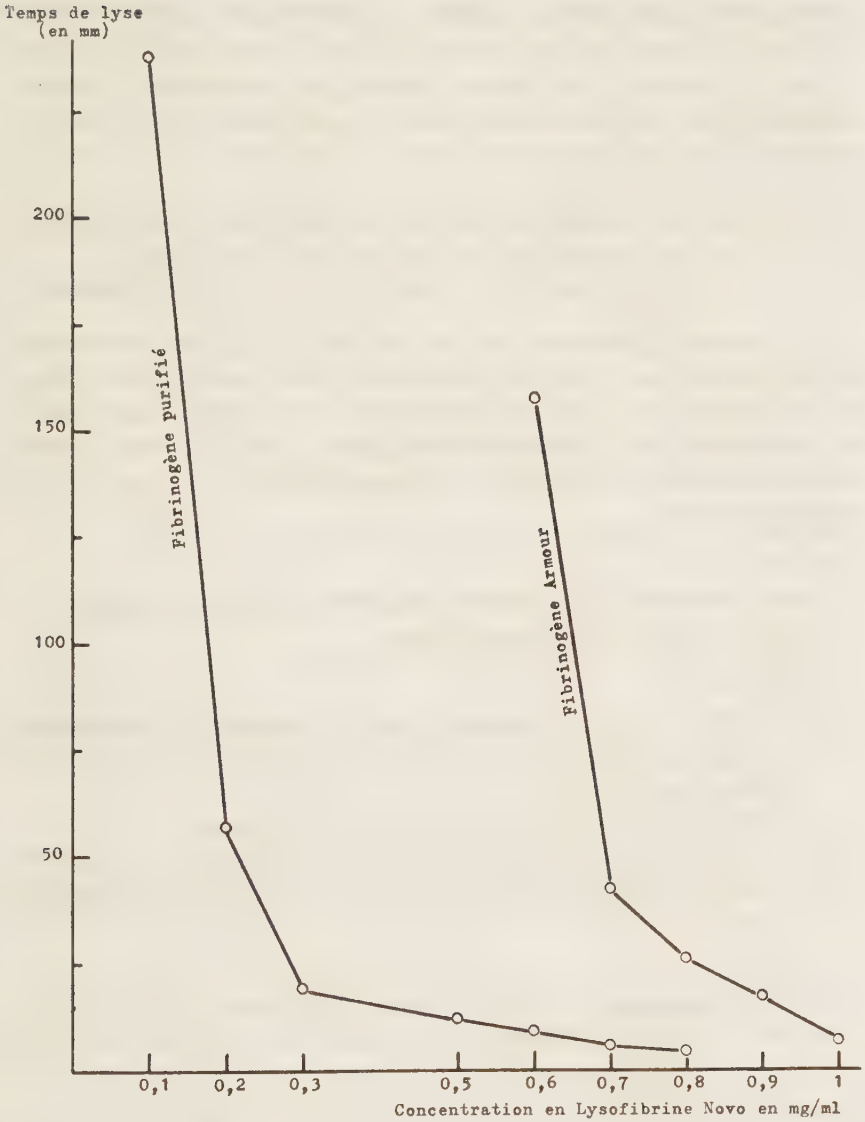


FIG. 41. — Variations du temps de lyse thrombo-élastographique en fonction des concentrations en lysofibrine Novo.

que le fibrinogène purifié, exempt de plasminogène, est nettement plus sensible à cet enzyme que le fibrinogène non purifié Armour.

En conclusion, ces essais mettent en évidence la grande sensibilité du thrombo-élastographe, aussi bien à la pureté du substrat qu'à la qualité des enzymes utilisés.

D. ÉTUDE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE DE LA LYSE DU CAILLOT DE FIBRINE PAR ACTION DE LA TRYPSINE OU DE LA CHYMOTRYPSINE

A côté de la plasmine, enzyme physiologiquement responsable de la fibrinolyse, d'autres protéases sont susceptibles d'agir sur la fibrine. Dans le but d'explorer de façon plus approfondie la sensibilité du thrombo-élastographe, nous avons étudié l'action de deux enzymes d'origine animale, la trypsine et la chymotrypsine.

Protocole.

Nous décrirons le protocole commun appliqué à l'étude de la trypsine et de la chymotrypsine.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin Armour correspondant à 0,8 pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution de trypsine ou de chymotrypsine.
Trypsine Armour titrant 3 200 unités Armour par mg (*). Solution-mère contenant 1 mg/ml (tampon phosphate *p*H 8,0.

Dilutions	Conc. finales (µg/ml)
1/100	10
2/100	20
5/100	50
1/10	100

(*) 3 200 unités Armour = 36 unités FIP pour la trypsine

Chymotrypsine Armour titrant 1 200 unités Armour par mg (*).

Solution-mère contenant 1 mg/ml (tampon phosphate *p*H 8,0.

Dilutions	Conc. finales (μg/ml)
1/100	10
2/100	20
3/100	30
4/100	40
4,4/100	44
5/100	50
7/100	70
8/100	80
1/10	100

— Solution de thrombine à 5 u.M./ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

Technique :

Dans la cuve du thrombo-élastographe sont introduites successivement :

Solution de fibrinogène bovin	0,15 ml
Dilution de trypsine ou de chymotrypsine. . .	0,10 ml
Solution de thrombine bovine	0,10 ml

L'addition de la thrombine au milieu s'effectue immédiatement après celle de trypsine ou de chymotrypsine et l'enregistrement est aussitôt après déclenché.

Résultats.

Nous avons rassemblé dans la *figure* 42 certains des tracés obtenus avec l'un ou l'autre des enzymes étudiés.

Dans le cas de la trypsine, aucun tracé ne présente la forme caractéristique des tracés de lyse. Pour une faible concentration en trypsine (10 μg/ml), *r* est très allongé, l'amplitude *am* dimi-

(*) 1 200 unités Armour = 308 unités FIP pour la chymotrypsine.

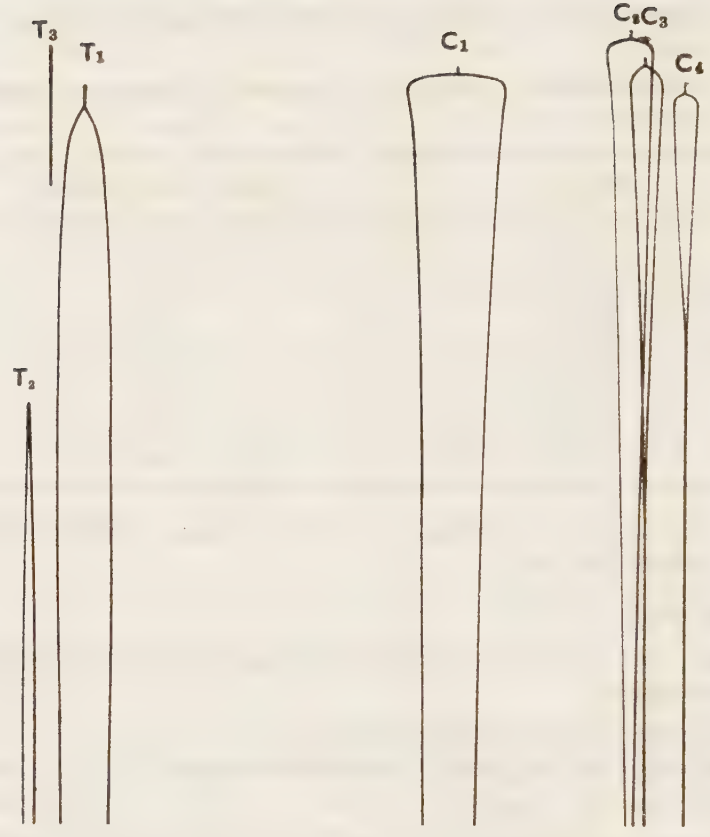


FIG. 42. — Tracés obtenus en présence de trypsine ou de chymotrypsine.

nuée, l'angle α également très diminué. Pour une concentration double (20 µg/ml), la protéolyse semble être si précoce que le tracé présente une amplitude maxima de 2 mm seulement et que cette amplitude est invariable pendant 60 minutes. Il semble donc que l'activité trypsique se manifeste d'emblée par une

fibrinogénolyse si intense qu'aucun tracé n'objective ensuite de fibrinolyse par défaut de fibrine initiale.

Les résultats obtenus avec la chymotrypsine sont très différents. Les tracés présentent une allure assez comparable à celle donnée par la « lysofibrine » ; l'angle de lyse (tg Θ) est maximum quand l'angle α de coagulation est minimum. Le temps de lyse thrombo-élastographique diminue rapidement pour des concentrations croissantes en chymotrypsine (*figure* 43).

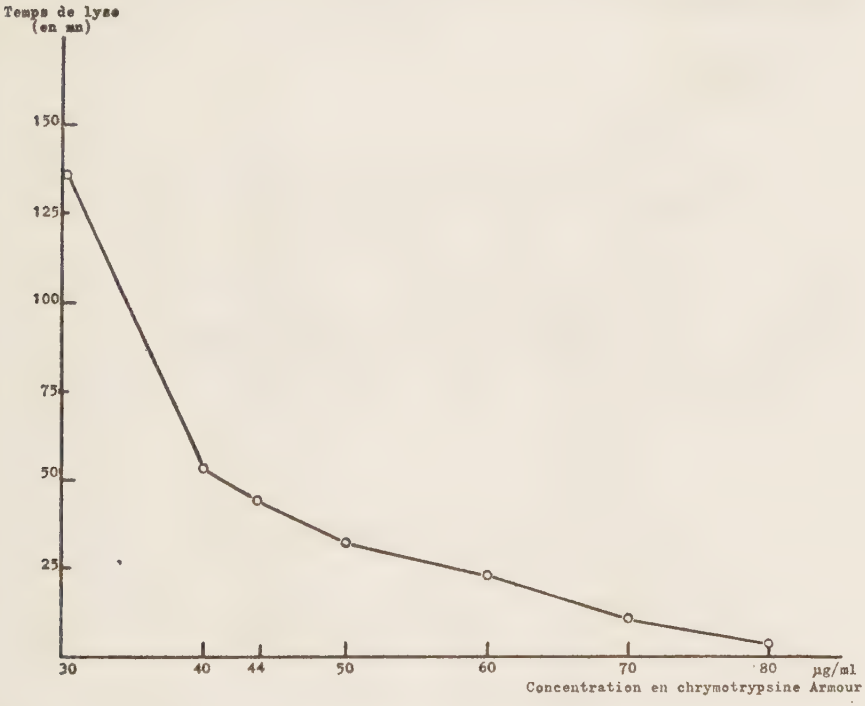


Fig. 43. — Variations du temps de lyse thrombo-élastographique en fonction de la concentration en chymotrypsine.

Bien que l'angle de lyse augmente régulièrement en fonction des concentrations en chymotrypsine, ce qui est comparable à la « lysofibrine », il semble que l'action de la chymotrypsine

soit plus fibrinogénolytique que fibrinolytique. En effet, pour des temps de lyse du même ordre, l'amplitude maxima est de loin supérieure sous l'action de la « lysofibrine » (23 mm) à celle obtenue avec la chymotrypsine (9 mm).

Nous avons voulu objectiver cette action fibrinogénolytique de la chymotrypsine [387]. La *figure* 44 représente les tracés obtenus avec la chymotrypsine après incubation variable de cet enzyme et du fibrinogène.

Temps	d'incubation
1	0
2	1 minute
3	2 minutes
4	3 minutes

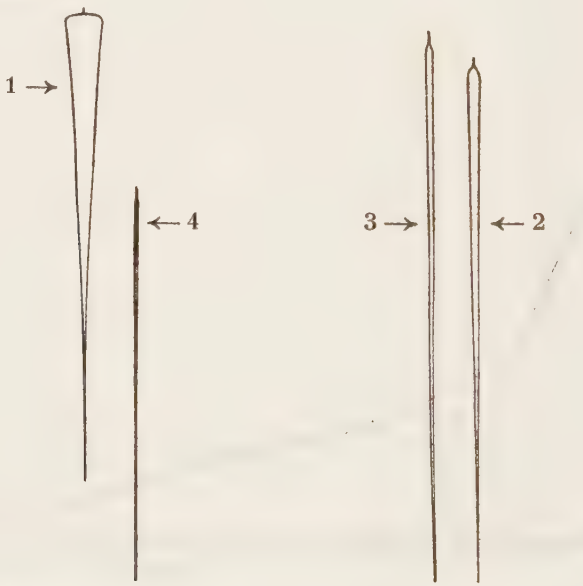


FIG. 44. — Tracés obtenus après incubation préalable du fibrinogène avec la chymotrypsine (*) Armour.

(*) 0,15 ml de solution de fibrinogène Armour à 0,8 pour 100 de protéines coagulables. 0,10 ml de solution de chymotrypsine à 40 µg/ml. Incubation : 1 à 3 minutes. 0,10 ml de solution de thrombine à 5 u.M./ml.

L'action fibrinogénolytique se manifeste déjà de façon importante à la concentration de 40 µg/ml de chymotrypsine, en une minute.

En conclusion, l'activité trypsique, étudiée qualitativement au thrombo-élastographe, semble être principalement fibrinogénolytique alors que l'activité chymotrypsique est à la fois fibrinogénolytique et fibrinolytique. La fibrinolyse par la chymotrypsine se trouve considérablement accentuée au thrombo-élastographe par son action fibrinogénolytique, ce qui permet de la différencier de la plasmine.

*

* *

ÉTUDE PARALLÈLE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE PAR LES MÉTHODES ENZYMATIQUES

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous nous proposons de déterminer par des méthodes biochimiques l'activité des différents enzymes précédemment utilisés au thrombo-élastographe. Ceci nous est apparu comme un moyen d'apprécier s'il existe ou non une concordance entre la méthode thrombo-élastographique et les méthodes biochimiques.

Deux types de substrat ont été utilisés à cet effet : la caséine et la fibrine.

I. MÉTHODE CASÉINOLYTIQUE

L'utilisation de la caséine comme substrat des enzymes protéolytiques a fait l'objet de nombreux travaux [10], [181], [457].

La technique que nous avons adoptée est celle de Remmert et Cohen [457], reprise par Mourad [406]. Une des difficultés de cette méthode est la nécessité de disposer d'un substrat soluble pur. Ceci exige un traitement préalable des préparations commerciales de caséine selon le procédé décrit par Muellertz [408] et repris par Mourad [406].

A. — PRINCIPE DE LA MÉTHODE CASÉINOLYTIQUE UTILISÉE

Le principe de cette méthode est de mesurer, après incubation à 37 °C pendant 60 minutes, la quantité de tyrosine libérée par protéolyse de la caséine. L'unité proposée dans ce cas varie d'après les auteurs selon la quantité de tyrosine libérée [406] (*tableau* XXXI).

Nous avons adopté, comme Mourad [406], conformément aux normes de l'Union internationale de Biochimie, l'unité définie par la libération d'une micromole de tyrosine en une minute.

B. — DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1. **Préparation de caséine purifiée.**

A partir d'une caséine de qualité « Hammarsten », nous avons procédé à une purification selon la technique décrite par Mourad [406]. Le produit obtenu, conservé au congélateur en solution à 3 pour 100 dans le tampon phosphate *p*H 8,0, a fait l'objet de contrôles périodiques avec un enzyme (chymotrypsine) de référence.

2. **Détermination de l'activité caséinolytique des différents enzymes utilisés.**

Nous allons décrire le protocole commun adopté pour la détermination de l'activité caséinolytique des différents enzymes étudiés : fibrinolysine Merck, lysofibrine Novo, plasminogène NBC activé par la streptokinase, trypsine Armour, chymotrypsine Armour.

Réactifs.

— Solution de caséine purifiée.
— Tampon phosphate *p*H 8,0.
— Solution d'enzymes :

— Fibrinolysine Merck.
Solution à 100 mg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
— Lysofibrine Novo.
Solution à 10 mg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
— Plasminogène NBC.
Solution à 5 mg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
— Trypsine.
Solution à 10 µg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
— Chymotrypsine.
Solution à 5 µg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
— Solution d'acide trichloracétique à 10 pour 100.

Technique.

Les réactifs sont introduits dans un tube à essai plongé dans un bain-marie à 37 °C dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-après.

Tubes n°	1	2	3	...	n
Solution de caséine en ml	3	3	3	...	3
Tampon phosphate *p*H 8,0 en ml	2,9	2,5	2	...	0
Solution d'enzyme en ml	0,1	0,5	1	...	3
Volume total en ml	6	6	6	...	6

Dans le cas particulier du plasminogène, il faut ajouter au milieu 0,1 ml de plasma humain (apport de proactivateur) et 0,1 ml d'une solution de streptokinase titrant 5 000 unités Christensen par ml (dose équivalente à celle choisie par d'autres auteurs [10], [181], [406], [457]).

Deux ml sont prélevés de chaque tube aussitôt après le mélange et introduits dans un tube à centrifuger contenant 3 ml de solution trichloracétique (tubes témoins). Les tubes

TABLEAU XXXI

Tableau des unités caséinolytiques

Définition de l'unité caséinolytique	Concentration finale en substrat (caséine)	Auteurs
450 µg tyrosine/ 60 minutes	1,5 pour 100 (purifié selon Muellertz)	Kline et Fishman (1961) [285].
	2 pour 100 (purifié selon Muellertz)	Sgouris et coll. (1960) [490].
	4 pour 100	Remmert, Cohen (1959) [457].
180 µg tyrosine/ 60 minutes	2 pour 100	Alkjaersig et coll. (1959) [10].
	2 pour 100 (purifié selon Muellertz)	Deutsch, Fischer (1960) [144].
150 µg tyrosine/ minute	2 pour 100	Kunitz (1947) [229].
1 µg tyrosine/minute	0,7 pour 100 (α– caséine)	Derechin (1961) [139].
	1,5 pour 100	Hipp et coll. (1952) [252].
	1,5 pour 100 (purifié selon Muellertz)	Muellertz (1955) [408].
Δ 1 en D.O./minute à 280 mµ après 30 minutes d'incubation à 37 °C	2 pour 100	Kunitz (1947) [299].
	2 pour 100	Norman (1957) [428].
Δ 1 en D.O./minute à 280 mµ après 60 minutes d'incubation à 37,5 °C	1,5 pour 100 (purifié selon Muellertz)	Markus, Ambrus (1960) [371].
1 µM tyrosine libérée par minute (unité recommandée par U.I.B.).	1,5 pour 100 (purifié selon Muellertz)	Mourad (1964) [406] (unité adoptée).

de réaction sont maintenus au bain-marie à 37 °C pendant 60 minutes exactement, à partir de l'addition de l'enzyme. Au bout de ce temps, 2 ml sont à nouveau prélevés dans chaque tube puis introduits dans un autre tube à centrifuger contenant 3 ml de solution trichloracétique.

Les déféquats trichloracétiques correspondant aux tubes témoins et aux tubes à réaction sont centrifugés, à 4 500 tours/minute, 30 minutes après le mélange. Les surnageants sont alors filtrés sur coton de verre lavé (*).

Les filtrats de réaction sont lus contre les filtrats témoins au spectrophotomètre à 275 mμ.

3. **Élaboration d'une courbe étalon de tyrosine.**

Une courbe étalon de tyrosine est établie selon le protocole décrit par Mourad [406] à partir d'un échantillon de tyrosine pure (tyrosine Novo).

C. — RÉSULTATS

1. **Courbe étalon de tyrosine.**

La courbe étalon obtenue est représentée dans la *figure* 45.

2. **Fibrinolysine Merck.**

La *figure* 46 représente la variation de la quantité de tyrosine libérée en fonction de quantités croissantes de fibrinolysine Merck (2,5 à 200 mg dans le milieu réactionnel).

La partie strictement linéaire de cette courbe se situe entre 0 et 10 mg d'enzyme puis la courbe tend à s'incurver très progressivement.

(*) Coton de verre « hyperfin Prolabo » lavé au mélange :
{ Tampon phosphate *p*H 8,0 . . . . . 40 pour 100
{ Acide trichloracétique 10 pour 100 . . . . . 60 pour 100
puis rincé à l'eau distillée, séché et contrôlé (eau de lavage donnant une d.o. à 275 mμ égale et non supérieure à celle de la solution non filtrée).

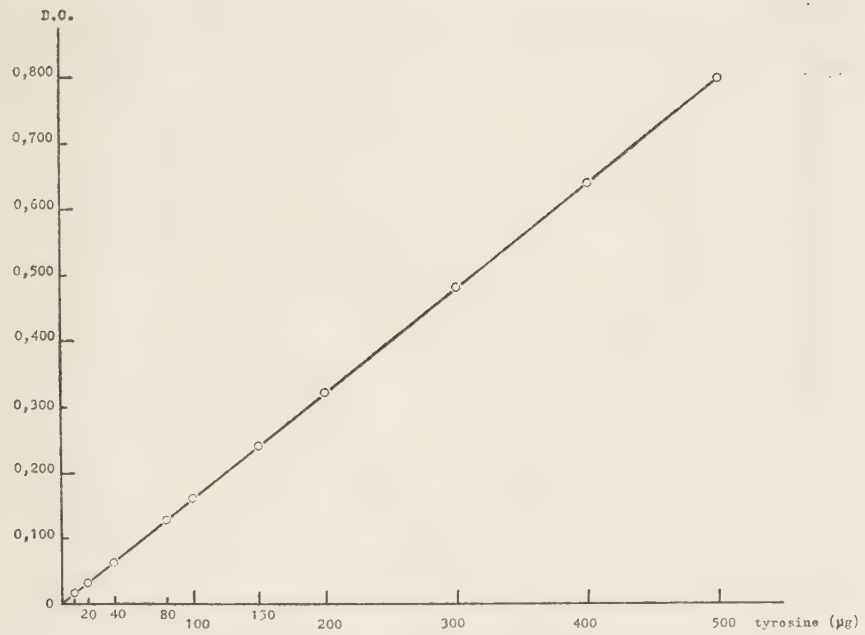


Fig. 45. — Courbe étalon de tyrosine pour le dosage de l'activité caséinolytique des enzymes protéolytiques.

3. **Lysofibrine Novo.**

Les résultats obtenus sont représentés dans la *figure* 47 Les quantités d'enzymes varient de 1 à 30 mg. La partie linéaire de la courbe se situe entre 0 et 5 mg.

4. **Plasminogène NBC** (*).

Pour des quantités de plasminogène variant entre 0 et 10 mg (*figure* 48), l'activité caséinolytique est directement proportionnelle à la quantité de zymogène. Notons que la quantité de

(*) Plasminogène NBC (Nutritional Biochemical Corporation) : Fraction plasmatique bovine III, 3 de Cohn.

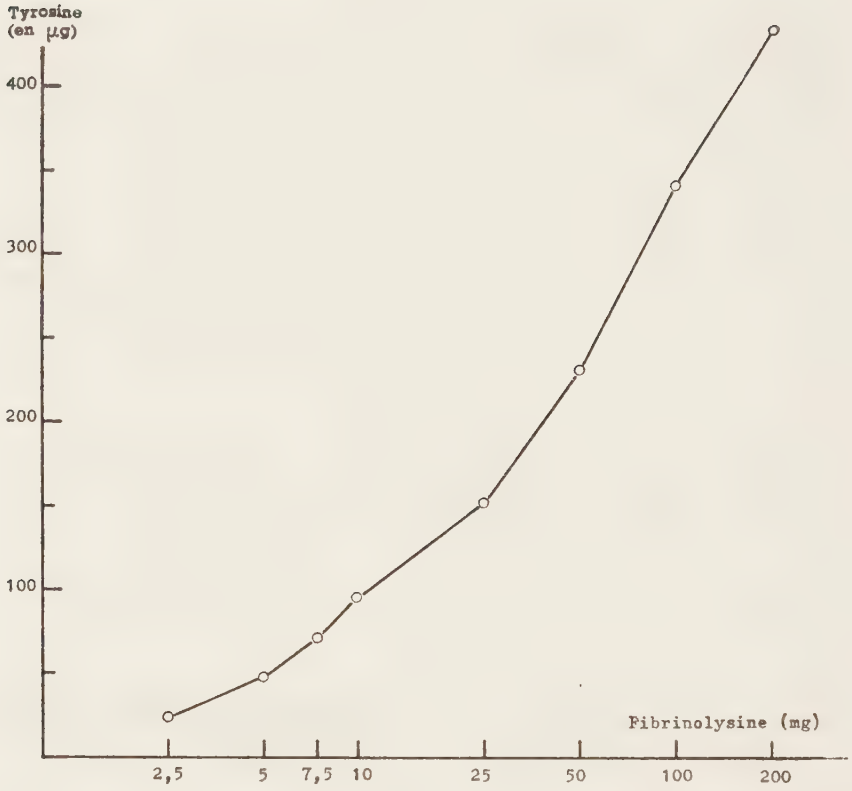


FIG. 46. — Variations de la quantité de tyrosine libérée en fonction de doses croissantes en fibrinolysine Merck.

streptokinase utilisée pour provoquer l'activation dn plasminogène a été choisie en accord avec différents auteurs [10] [181], [406], [457].

5. Trypsine et chymotrypsine.

Les courbes d'activité caséinolytique de ces deux enzymes sont représentées dans les *figures* 49 et 50 pour des quantités allant de 0 à 30 µg.

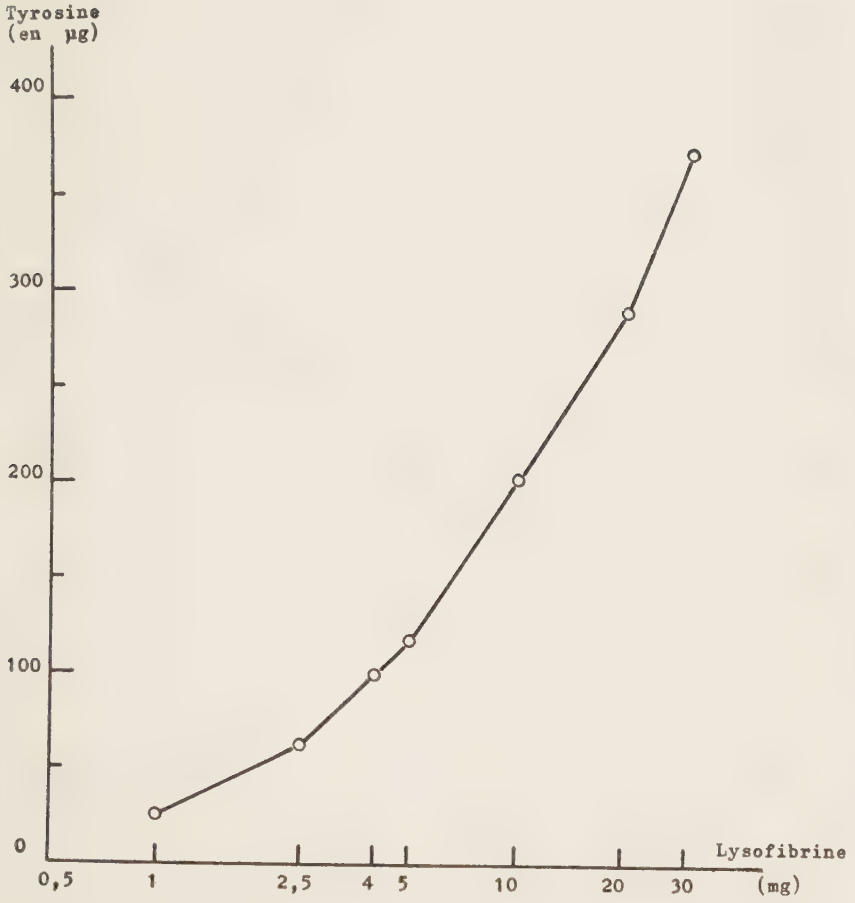


Fig. 47. — Variations de la tyrosine libérée par caséinolyse en fonction de doses croissantes en lysofibrine Novo.

Il est à noter que la courbe d'activité caséinolytique de la trypsine s'infléchit à partir de 5 µg de cet enzyme alors qu'elle reste encore linéaire pour une dose correspondante à 15 µg de chymotrypsine.

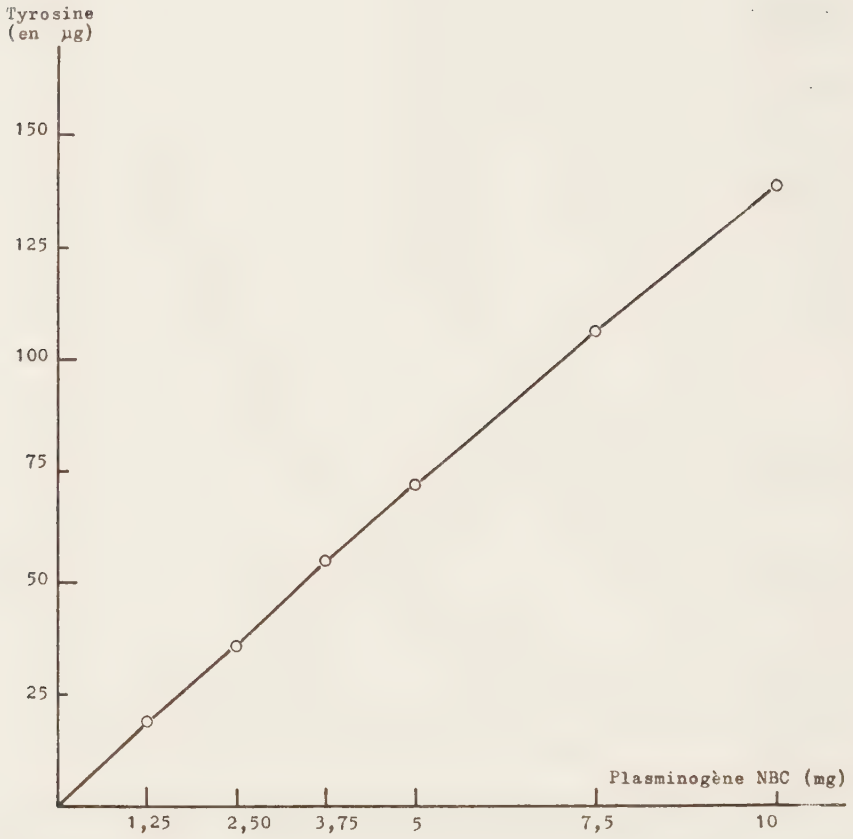


FIG. 48. — Variations de la tyrosine libérée par caséinolyse en fonction de doses croissantes en plasminogène NBC.

D. — TABLEAU RÉCAPITULATIF DE L'ACTIVITÉ CASÉINOLYTIQUE DES DIFFÉRENTS ENZYMES ÉTUDIÉS

Pour calculer cette activité caséinolytique, nous choisissons, sur la partie linéaire de chacune des courbes obtenues, un point, qui nous donne, pour une certaine quantité d'enzyme, la quantité

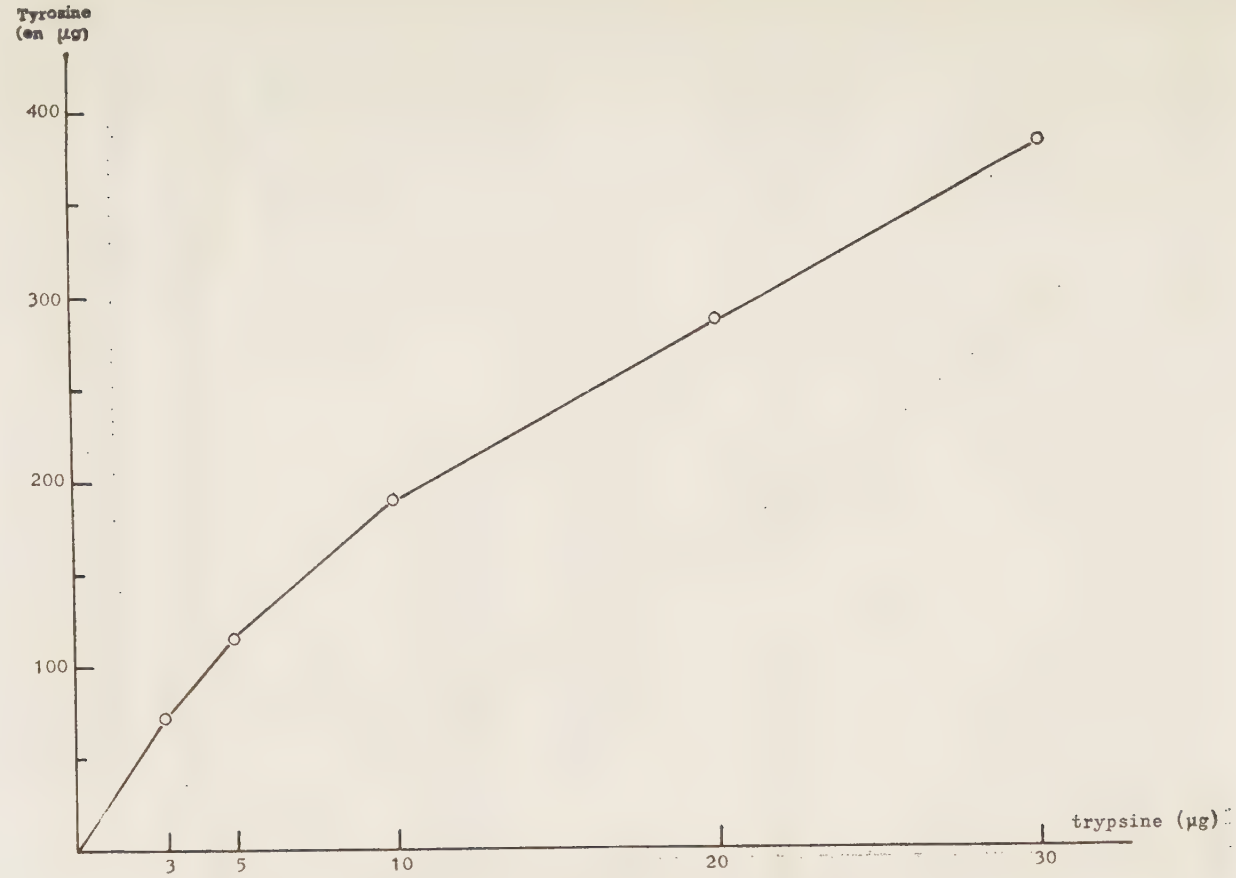


FIG. 49. — Variations de la tyrosine libérée par caséinolyse en fonction de doses croissantes en trypsine Armour.

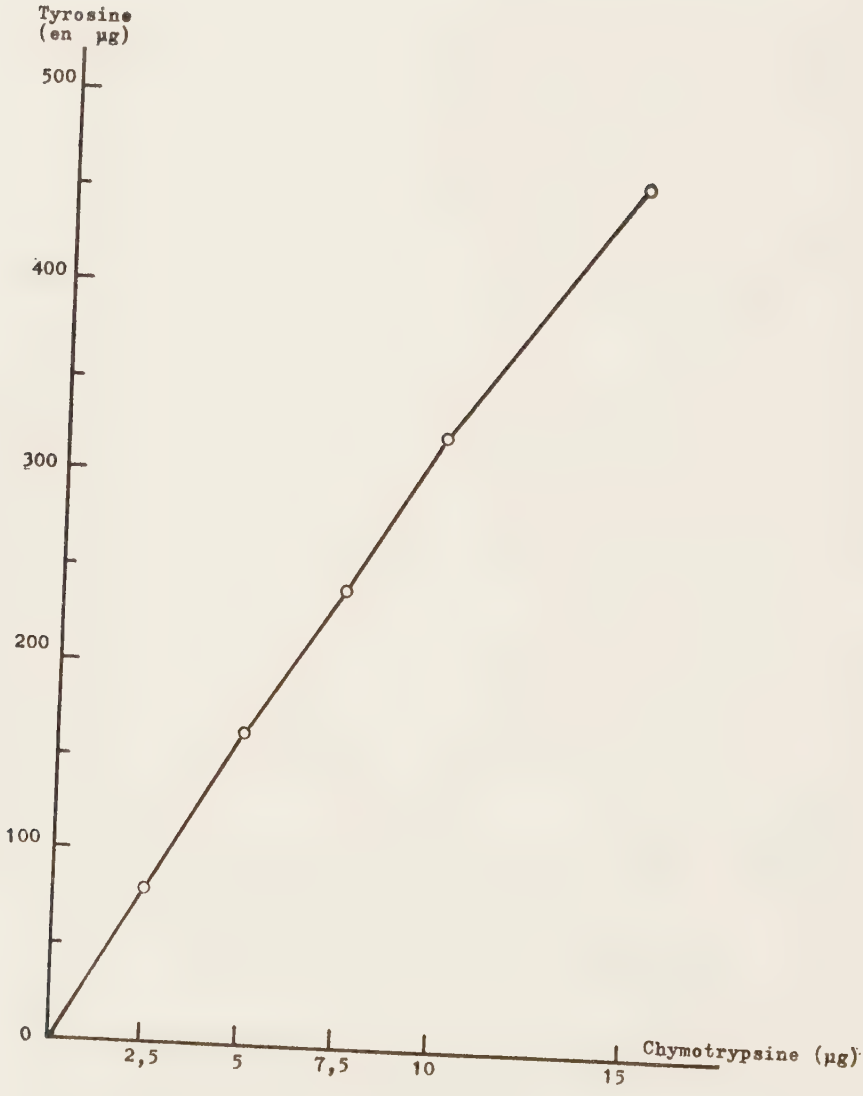


FIG. 50. — Variations de la tyrosine libérée par caséinolyse en fonction de doses croissantes en chymotrypsine Armour.

correspondante de tyrosine (exprimable en micromoles) libérée en 60 minutes dans 2 ml d'un tube à réaction de 6 ml.

Le calcul des unités caséinolytiques par g de préparation enzymatique se fera de la façon suivante :

$$\text{Unités caséinolytiques (*) par g de préparation enzymatique} = \frac{\text{Nombre de } \mu\text{M de tyrosine libérée}}{60} \times \frac{6}{2} \times \frac{1}{\text{g d'enzyme}}$$

soit :

$$\frac{\text{Tyrosine libérée en } \mu\text{g}}{181 \times 20 \times \text{g d'enzyme}}$$

où 181 = poids moléculaire de la tyrosine.

Les résultats obtenus pour chacun des enzymes étudiés sont rassemblés dans le tableau suivant.

TABLEAU XXXII

Tableau d'activité caséinolytique des préparations enzymatiques utilisées en unités internationales par *g* de produit

Enzymes	Activité caséinolytique par g en unités internationales (*)
Fibrinolysine Merck	2,65
Lysofibrine Novo	6,97
Plasminogène NBC activé	3,81
Trypsine Armour	6 628,83
Chymotrypsine Armour	8 895,02

(*) L'unité caséinolytique proposée (= UC) se définit donc, dans les conditions opératoires de l'essai, comme étant l'activité nécessaire pour libérer une micromole de tyrosine par minute.

II. — MÉTHODE DE MESURE DE LA FIBRINO-FORMATION ET DE LA FIBRINOLYSE PAR DOSAGE DE LA FIBRINE

La fibrinolyse présente, en tant que réaction enzymatique, au moins deux particularités :

— La première est le fait que la réaction est objectivée par une modification, visible à l'œil nu, du substrat. Le caillot de fibrine se réduit en effet, progressivement, au cours de la protéolyse, comme un morceau de glace fondant dans l'eau, en libérant dans le milieu des produits de réaction solubles.

— La seconde est que ce substrat ne se définit pas uniquement par sa constitution chimique mais par sa structure même. Il est formé de fibres de fibrine donnant au caillot, en fonction de leur enchevêtrement, des qualités physico-chimiques propres. Pour présenter une telle structure le caillot doit être natif, c'est-à-dire formé dans le milieu même de la réaction, par suite d'une autre réaction enzymatique préliminaire qui est la fibrino-formation. La seule possibilité de standardisation de ce substrat consiste en fait à définir des conditions bien déterminées de formation du caillot de fibrine.

La mesure de la fibrinolyse peut être réalisée, comme pour les autres réactions enzymatiques, soit par la mesure des produits de réaction, soit par la mesure, dans le temps, de la quantité de substrat protéolysée, procédé le plus fréquemment utilisé dans son principe, mais variant notablement quant aux méthodes.

De nombreuses méthodes de dosage de la fibrine ont été proposées en vue de dosages de fibrinogène par transformation en fibrine. Les principales sont rassemblées dans le *tableau* XXXIII.

Guest et Celander [207] ont proposé de mesurer la lyse du caillot en dosant la quantité de fibrine initiale puis la quantité de fibrine résiduelle au cours de la réaction. Mais leur technique consiste à séparer le caillot de fibrine par filtration, ce qui se prête mal à une microméthode, et à le doser, après hydrolyse alcaline, par coloration des fonctions phénols libérées, au moyen

TABLEAU XXXIII

PRINCIPALES MÉTHODES DE DOSAGE DU FIBRINOGÈNE PAR TRANSFORMATION EN FIBRINE

Par addition de Ca^{2+}	
Colorimétrie au biuret (fibrine)	TRAISNEL et DOUMER (1950) [532].
Méthode pondérale	FAVRE-GILLY et coll. (1965) [169].
Par addition de Ca^{++} et de thromboplastine	
Colorimétrie au biuret (fibrine)	LE POLLES et FROCRAIN (1959) [328].
Par addition de thrombine	
Spectrophotométrie	LAKI (1951) [306]. JACOBSSON (1955) [260]. BLOMBAECK B. et M. (1956) [69]. BERGSTRŒM et coll. (1960) [53]. MOSESSON (1962) [402].
Colorimétrie : – au Folin-Ciocalteu (tyrosine) – au biuret (fibrine)	RATNOFF et MENZIE (1951) [455]. LECLERC et KHODABANDEH (1953) [327]. REINER et CHEUNG (1959) [456].
– à la fuchsine	LAZAR (1967 [326].
Chronométrie du temps de coagulation de différentes dilutions	VON CLAUSS (1957) [551]. DESTAING et coll. (1960) [141].
Détermination visuelle de la coagulation à la plus forte dilution possible	SCHNEIDER (1952) [476]. TOCANTINS (1955) [in 531]. BOWMAN et YELITO (1957) [85].

du réactif de FOLIN-CIOCALTEU. Cette hydrolyse entraîne une variabilité non négligeable des résultats.

Par contre, la technique proposée par LECLERC et KHODABANDEH [327] pour le dosage du fibrinogène plasmatique, nous paraît susceptible de se prêter plus aisément à une

comparaison avec la thrombo-élastographie. Le caillot de fibrine est en effet séparé par centrifugation, ce qui permet, comme le souligne Leclerc, de faire tout le dosage dans un même tube à centrifuger. D'autre part, la fibrine est dosée, après dissolution en milieu alcalin, par coloration à l'aide du réactif du biuret selon Gornall [203], ce qui conduit à des résultats plus reproductibles. Cette technique se prête à un microdosage, ce qui permet de doser encore la fibrine résiduelle dans un intervalle de 2 à 6 mg [186] (*).

Cette microméthode doit nous permettre d'opérer dans des conditions aussi voisines que possible de celles réalisées dans la cuve du thrombo-élastographe. Il subsistera cependant une différence entre les deux méthodes liée à la traction exercée sur les fibres de fibrine par la rotation de la cuve. Dans la mesure où la thrombo-élastographie est le reflet des propriétés élastiques du caillot [119], [220], le mouvement de la cuve ne devrait pas modifier la qualité du substrat et la vitesse de protéolyse.

Nous décrirons tout d'abord la technique utilisée, puis son application soit à la mesure de la fibrino-formation, soit à la mesure de la fibrinolyse.

A. — DESCRIPTION DE LA MÉTHODE UTILISÉE.

Si le protocole décrit par Leclerc nous est apparu comme le meilleur en vue d'un dosage chimique de la fibrine, il s'est avéré néanmoins nécessaire d'apporter à cette technique, en vue de son application à l'étude de la fibrinolyse, un certain nombre de modifications. Nous énumérerons tout d'abord ces modifications avant de décrire la technique définitive.

Modifications apportées à la technique de Leclerc.

a) Le plasma est ici remplacé par une solution de fibrinogène contenant environ 0,5 g pour 100 de protéines coagulables.

(*) Pour obtenir la meilleure précision dans l'évaluation colorimétrique selon la technique de Gornall, il faut, en valeur absolue, dans les deux millilitres de solution protéique ajouter aux huit millilitres du réactif de Gornall quatre à douze milligrammes de protéines [186].

Normalement pour un dosage de fibrine sur cette solution, la prise d'essai doit être, comme l'indique Leclerc pour le plasma, de 0,5 ml. Mais, dans le cas de l'étude de la fibrinolyse, la protéolyse du caillot risque d'être telle que la quantité de fibrine résiduelle peut devenir, pour une telle prise d'essai de 0,5 ml, trop faible, et à la limite inférieure de sensibilité de la méthode. Il nous a donc paru nécessaire d'augmenter cette prise d'essai. Nous avons choisi un volume de 2,5 ml de solution de fibrinogène pour deux raisons : la première est que cette prise d'essai représente dix fois le volume utilisé au thrombo-élastographe, ce qui permet de faire varier tous les réactifs dans une même proportion, la seconde est que, lorsque la lyse est nulle, on peut dissoudre la fibrine dans plusieurs ml de soude normale, puis en prélever une partie aliquote de 1 ml, y ajouter 4 ml de réactif du biuret, et se retrouver ainsi dans les conditions habituelles. Si la lyse est intense, par exemple de 80 pour 100, on peut dissoudre la fibrine dans un volume minimum de soude normale pour obtenir 1 ml de solution, y ajouter directement 4 ml de réactif du biuret et se retrouver à nouveau dans les conditions habituelles.

b) Dans la technique décrite par Leclerc, la coagulation est réalisée par mélange de 0,5 ml de plasma dans 10 ml de solution coagulante. Ces conditions opératoires sont très différentes de celles dans lesquelles nous nous trouvons au thrombo-élastographe où la fibrino-formation est réalisée par addition de 0,10 ml de solution coagulante à 0,25 ml de solution de fibrinogène. Pour rester dans des conditions très voisines du thrombo-élastographe et pour respecter le rapport de 1 à 10 concernant les volumes de solution de thrombine et de fibrinogène, nous utiliserons donc 1 ml de solution coagulante pour 2,5 ml de solution de fibrinogène.

En définitive, les modifications apportées à la technique de Leclerc portent essentiellement sur les volumes respectifs des réactifs utilisés. Ces modifications sont résumées au *tableau* XXXIV.

TABLEAU XXXIV

DOSAGE DE LA FIBRINE SELON LA MÉTHODE DE LECLERC

COMPARAISON DU PROTOCOLE DONNÉ PAR LECLERC POUR LE PLASMA ET DU PROTOCOLE ADOPTÉ PAR NOUS-MÊME POUR UNE SOLUTION DE FIBRINOGÈNE

	Protocole de Leclerc	Protocole suivi pour une solution de fibrinogène
Préparation à doser	Plasma 0,5 ml	Solution de fibrinogène bovin à 0,5 pour 100 de protéines coagulables 2,5 ml
Thrombine	10 ml de solution à 2 u.M./ml	1 ml de solution à 5 u.M./ml
Solubilisation du caillot	1 ml de solution normale de soude	Solution normale de soude q.s.p. 1 à 5 ml selon les cas.
Coloration	4 ml de réactif de GORNALL + 1 ml de solution sodique	4 ml de réactif de GORNALL + 1 ml de solution sodique.

Technique adoptée.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène contenant 0,5 g pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 7,4.
— Solution de thrombine à 5 u.M./ml dans le même tampon.
— Solution aqueuse de chlorure de sodium à 9 pour 1 000.
— Solution normale de soude.
— Réactif du biuret selon GORNALL [203].

Mode opératoire :

Le mode opératoire sera décrit séparément pour l'étude de la fibrino-formation d'une part, et de la fibrinolyse d'autre part.

B. — APPLICATION DE LA MÉTHODE A L'ÉTUDE DE LA FIBRINO-FORMATION.

Après une description du mode opératoire adopté, nous étudierons successivement, par comparaison avec l'étude faite au thrombo-élastographe, l'influence de la concentration en thrombine puis l'influence des ions calcium sur la quantité de fibrine formée. Nous donnerons ensuite les résultats obtenus à partir de trois préparations différentes de fibrinogène commercial.

1. Mode opératoire.

Dans un tube à centrifuger conique, porté au bain-marie à 37 °C sont introduits 2,5 ml de la solution de fibrinogène puis, au bout de quelques minutes, 1 ml de solution de thrombine. Après agitation le mélange est maintenu au bain-marie pendant 30 minutes puis additionné, en agitant, de 5 à 8 ml de solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000. La fibrine est séparée par centrifugation pendant 10 minutes à 5 000-6 000 tours/minute. Après décantation et lavage au moyen de 5 ml de solution chlorurée, on centrifuge à nouveau et on décante le surnageant. Le caillot de fibrine est alors dissous au bain-marie à 60-70 °C dans la soude normale. Le volume de soude utilisé est compris entre 1 et 5 ml selon l'importance du caillot, comme nous l'avons expliqué plus haut. Après refroidissement à 20-25 °C 1 ml de la solution sodique est mélangé à 4 ml de réactif du biuret. Le mélange est laissé 30 minutes à la température du laboratoire puis la coloration est lue au spectophotomètre à 540 mμ contre un blanc obtenu par mélange de 1 ml de soude normale et 4 ml de réactif du biuret.

Le résultat est calculé à partir d'une courbe étalon obtenue par coloration d'une solution de protéines (*) dans la soude normale, mélangée au réactif du biuret dans la proportion de 1 ml de solution pour 4 ml de réactif.

Cette courbe est représentée dans la *figure* 51. Elle montre que la coloration est directement proportionnelle à la quantité de protéines présentes, pour des prises d'essai contenant 2 à 6 mg de protéines [186].

2. Influence de la concentration en thrombine.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin Armour à 0,5 g pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 7,4 ;

— Solution-mère de thrombine bovine :

| Thrombine bovine . . . . . 100 u.M.
| Tampon phosphate *p*H 7,4 q.s.p. . . 5 ml

— Dilutions de la solution de thrombine :

Solution-mère de thrombine*	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon phosphate *p*H 7,4*	0,5	1,5	2,0	4,5	9,5	19,5	39,5	79,5
Dilutions	1/2	1/4	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
Conc. finale en u.M. par ml	10	5	4	2	1	0,5	0,25	0,125

* en ml

(*) Préparée à partir d'une préparation lyophilisée « Biotrol » qui, mise en solution, donne une concentration en 6,60 g pour 100 de protéines.

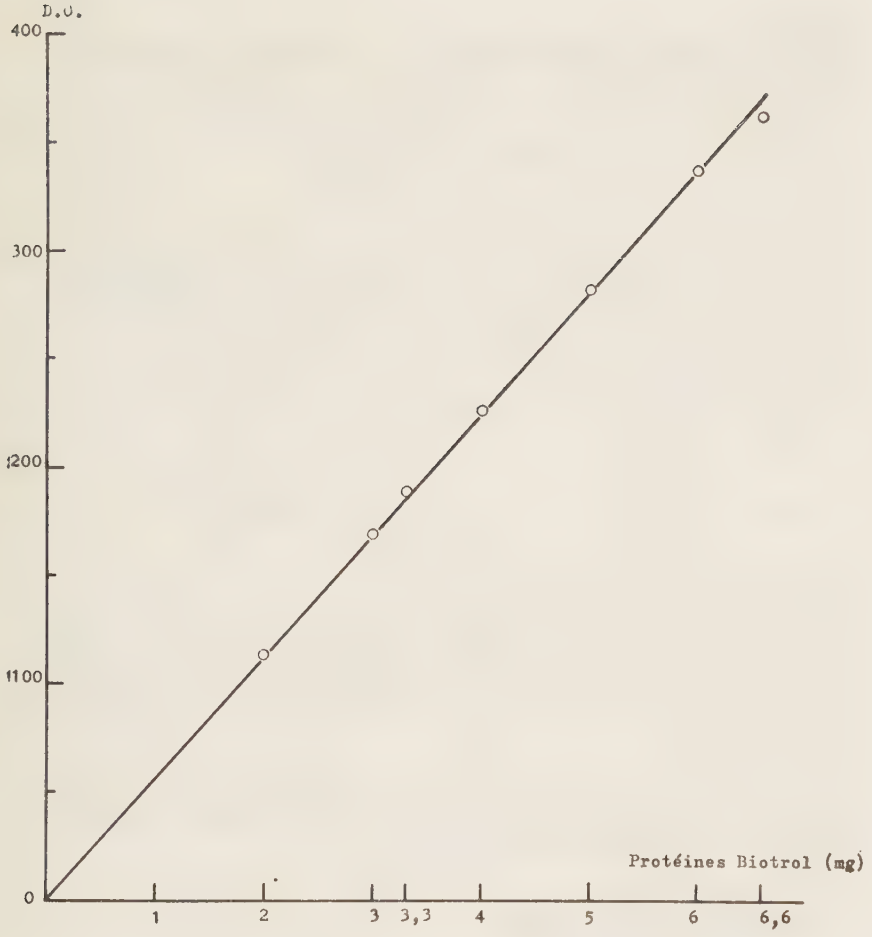


FIG. 51. — Courbe étalon en l'absorption protéique à 540 mμ par la méthode colorimétrique au biuret.

Mode opératoire :

Le mode opératoire est celui décrit plus haut. Chaque essai est pratiqué en double pour chacune des dilutions de thrombine étudiées.

Résultats.

Dans le *tableau* XXXV figurent les quantités de fibrine trouvées en fonction des concentrations en thrombine.

TABLEAU XXXV

Conc. en thrombine (u.M./ml)	Pourcentage de fibrinogène transformé en fibrine après 30 minutes
10	100
5	100
4	100
22	100
1	100
0,5	100
0,25	100
0,125	75,5

Ces résultats montrent que la quantité de fibrine formée ne varie pas pour des concentrations comprises entre 0,25 et 10 u.M./ml et ne diminue que pour des concentrations inférieures à 0,25 u.M./ml.

Notons qu'à la concentration en thrombine de 0,125 unités Mellanby nous n'avons pas obtenu, en une heure, d'amplitude au thrombo-élastographe.

3. **Influence des ions calcium.**

L'influence d'un excès d'ions calcium dans le milieu sera étudiée soit en présence d'une concentration suffisante de thrombine (5 u.M./ml), soit en présence d'une quantité insuffisante (0,125 u.M./ml) avec laquelle, comme nous l'avons vu précédemment, il ne se transforme en 30 minutes que 75,5 pour 100 du fibrinogène coagulable présent. Ceci a pour but de déterminer dans quelle mesure les ions calcium agissent sur la quantité de fibrine formée.

Protocole.

L'addition d'un excès d'ions calcium entraîne dans le tampon phosphate un précipité de phosphate de calcium. Aussi cet essai est-il réalisé en utilisant, comme nous l'avons fait au thrombo-élastographe, un tampon Barbital sodique au même *p*H (7,4).

Réactifs :

Les réactifs sont les mêmes que précédemment, sauf le tampon. Pour chaque concentration en thrombine (5 u.M./ml et 0,125 u.M./ml) deux solutions sont préparées, l'une dans le tampon Barbital sodique simple, l'autre dans le même tampon additionné de chlorure de calcium à une concentration finale de 0,1 M.

Mode opératoire :

Le mode opératoire utilisé est le même que précédemment.

Résultats.

Comme l'indique le *tableau* XXXVI, la quantité de fibrine formée dans les conditions du dosage ne varie pratiquement pas en présence d'un excès d'ions calcium.

TABLEAU XXXVI

INFLUENCE DES IONS CALCIUM SUR LA QUANTITÉ DE FIBRINE FORMÉE

Concentration de la solution de thrombine (u.M./ml)	Pourcentage de fibrinogène transformé en fibrine après 30 minutes	
	thrombine normale	thrombine calcique
0,125	75,5	75,1
5	100	100

u.M. = unités Mellanby

4. **Dosage de la fibrine formée à partir de différentes préparations de fibrinogène commercial.**

Nous avons utilisé 3 préparations de fibrinogène bovin déjà étudiées au thrombo-élastographe (*). Le dosage a été réalisé selon la technique déjà décrite, sur une solution à 1 g pour 100 de chacun de ces produits. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le *tableau* XXXVII.

TABLEAU XXXVII

DOSAGE DE LA FIBRINE FORMÉE A PARTIR DE 3 PRÉPARATIONS DIFFÉRENTES (SOLUTIONS A CONCENTRATIONS PONDÉRALES ÉGALES) DE FIBRINOGÈNE BOVIN

Fibrinogène	A	C	B
Taux de protéines totales, g pour 100	60,6	79,7	77,7
Taux de fibrine* g pour 100	45,0	56,9	57,3

* Protéines coagulables.

Ces résultats sont en accord avec les taux de protéines totales et protéines coagulables donnés par les fabricants pour les lots correspondants de chacun de ces fibrinogènes. Les fibrinogènes B et C ont pratiquement la même composition et diffèrent tous deux de A dont le taux de protéines coagulables est inférieur.

(*) Fibrinogène A : Armour Pharmaceutical Company.
Fibrinogène B : Calbiochem.
Fibrinogène C : Poviet.

C. — APPLICATION DE LA MÉTHODE A L'ÉTUDE DE LA FIBRINOLYSE

Cette partie constitue un des éléments essentiels de notre travail. En effet, comme nous l'avons souligné au début de ce chapitre, nous nous sommes proposé d'emblée de déterminer si le tracé thrombo-élastographique peut représenter une mesure valable de la fibrinolyse.

L'analyse de ce tracé nous a précédemment montré qu'il varie en fonction de l'activité enzymatique et que ceci se traduit par une variation du temps de lyse, puisqu'en vérité le tracé thrombo-élastographique est une forme d'enregistrement de la cinétique de la réaction. Nous avons observé en outre une variation des autres paramètres (α, *am*, tg Θ) puisque ceux-ci sont en rapport avec la quantité de substrat protéolysée au fur et à mesure de la réaction.

Mais, pour mieux connaître la véritable relation existant entre l'enregistrement thrombo-élastographique de la fibrinolyse et le processus réel de cette réaction enzymatique, il convient de procéder à une série de déterminations de la qualité de fibrine résiduelle au cours de la fibrinolyse, afin d'en déduire, à chaque fois, la quantité de substrat protéolysée sous l'action des enzymes présents dans le milieu.

Nous déterminerons successivement l'activité fibrinolytique de la plasmine à partir de deux préparations enzymatiques d'origine humaine ou porcine puis nous étudierons l'activité du plasminogène en présence de streptokinase. Dans ce cas particulier, il sera nécessaire d'utiliser un fibrinogène purifié, exempt de plasminogène, dont nous avons déjà décrit la préparation et les caractères analytiques principaux.

1. Modifications à apporter à la technique précédente en vue de l'étude de la lyse du caillot.

Comme dans le cas de l'étude thrombo-élastographique, il convient d'opérer pour l'étude de la lyse du caillot, au *p*H

optimum de la plasmine, c'est-à-dire à *p*H 8,0. En outre, en raison de l'addition de l'enzyme et pour ne pas modifier le volume final, il faut introduire le fibrinogène sous un volume plus faible (1,5 ml au lieu de 2,5 ml) en solution plus concentrée (0,8 pour 100 de protéines coagulables au lieu de 0,5 pour 100).

2. **Étude de l'action fibrinolytique de la plasmine.**

Nous étudierons, comme nous l'avons fait au thrombo-élastographe, l'action fibrinolytique de deux préparations de plasmine : la fibrinolysine Merck d'une part (plasminogène d'origine humaine activé par la streptokinase) et la lysofibrine Novo d'autre part (plasmine purifiée d'origine porcine). En ce qui concerne la fibrinolysine Merck, nous procéderons en outre à un dosage après incubation préalable de l'enzyme avec le fibrinogène, dans le but de distinguer l'action fibrinogénolytique de l'action fibrinolytique de cet enzyme.

a) *Effet fibrinolytique de la plasmine sans incubation préalable. Lyse du caillot de fibrine.*

Plasminogène d'origine humaine activé par la streptokinase (*fibrinolysine Merck*).

Nous avons successivement procédé à une étude cinétique de la réaction et ensuite à une détermination du pourcentage de fibrine protéolysée en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée au bout d'un temps déterminé. Nous décrirons tout d'abord le protocole commun à ces deux essais.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin Armour à 0,8 pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 8,0.
— Solution de plasmine (*).

(*) Un tableau général des activités respectives de ces enzymes dans différents systèmes d'unités sera donné au chapitre III.

— Solution-mère de fibrinolysine Merck à 12,5 mg/ml :

Fibrinolysine	125 mg
Tampon phosphate *p*H 8,0 q.s.p.	10 ml

— Dilutions de la solution-mère de plasmine :

Solution-mère de plasmine	3	1	1	1	0,5	1	0,5
Tampon phosphate *p*H 8,0	1	1	9	q.s.p. 20 ml		q.s.p. 100 ml	
Dilutions	314	1/2	1/10	1/20	1/40	1/100	1/200
Conc. finale en µg par ml	9375	6250	1250	625	312,5	125	62,5

— Solution de thrombine bovine à 5 u.M./ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution d'inhibiteur de plasmine (*) à 1 mg/ml.

Technique :

Sont introduits successivement dans un tube à centrifuger conique maintenu dans un bain-marie à 37 °C :

1,5 ml de solution de fibrinogène,
1 ml de solution de plasmine (**),
1 ml de solution de thrombine.

Au bout du temps d'incubation choisi, la réaction est arrêtée par addition de 1 ml de la solution d'inhibiteur introduit en agitant le milieu. La fibrine résiduelle est alors dosée selon la technique adoptée.

(*) Le produit utilisé est un inhibiteur de protéases d'origine végétale (PNTI : peanut trypsin inhibitor) fourni par l'Industrie Biologique Française S.A., 35-49, quai du Moulin-de-Cage, 92 - Gennevilliers, titrant 20 000 unités antitrypsiques Schwert et Takenaka par mg.

(**) L'étude cinétique de la réaction a été réalisée à partir de deux dilutions de la solution de plasmine ; dilution au 1/10 et dilution au 1/100.

Un tube témoin est réalisé dans chaque essai sans addition de plasmine en remplaçant la solution d'enzyme par un volume égal de solution tampon *p*H 8,0, dans le but de déterminer la quantité réelle de fibrine formée dans les conditions de la réaction.

Résultats.

La *figure* 52 représente les variations en fonction du temps de la quantité de fibrine protéolysée en présence de 1 250 µg/ml de fibrinolysine (courbe 1) et de 125 µg/ml de ce même enzyme (courbe 2).

La vitesse de réaction, très grande dans le premier cas, met en évidence, dans le second, l'existence d'un temps de latence (20 minutes) au bout duquel commence la protéolyse de la fibrine.

Dans le *tableau* XXXVIII sont représentées les variations du pourcentage de fibrine protéolysée en fonction de quantités croissantes en enzymes.

TABLEAU XXXVIII

Pourcentage de fibrine protéolysée en 10 minutes en fonction de quantités croissantes de fibrinolysine Merck

Fibrinolysine Merck (µg/ml)	Pourcentages de fibrine protéolysée
125	9 %
312,5	21,6 %
625	91,6 %
1 250	100 %

L'activité fibrinolytique mesurée au bout de 10 minutes d'incubation croît pour des quantités d'enzymes comprises entre 125 µg et 625 µg puis tend vers un maximum.

Plasmine purifiée d'origine porcine (lysofibrine Novo).

Cet enzyme a été étudié selon le même protocole que celui utilisé pour la fibrinolysine Merck. En présence d'une quantité

FIG. 52. — Courbes cinétiques de la fibrinolyse par la fibrinolysine Merck.

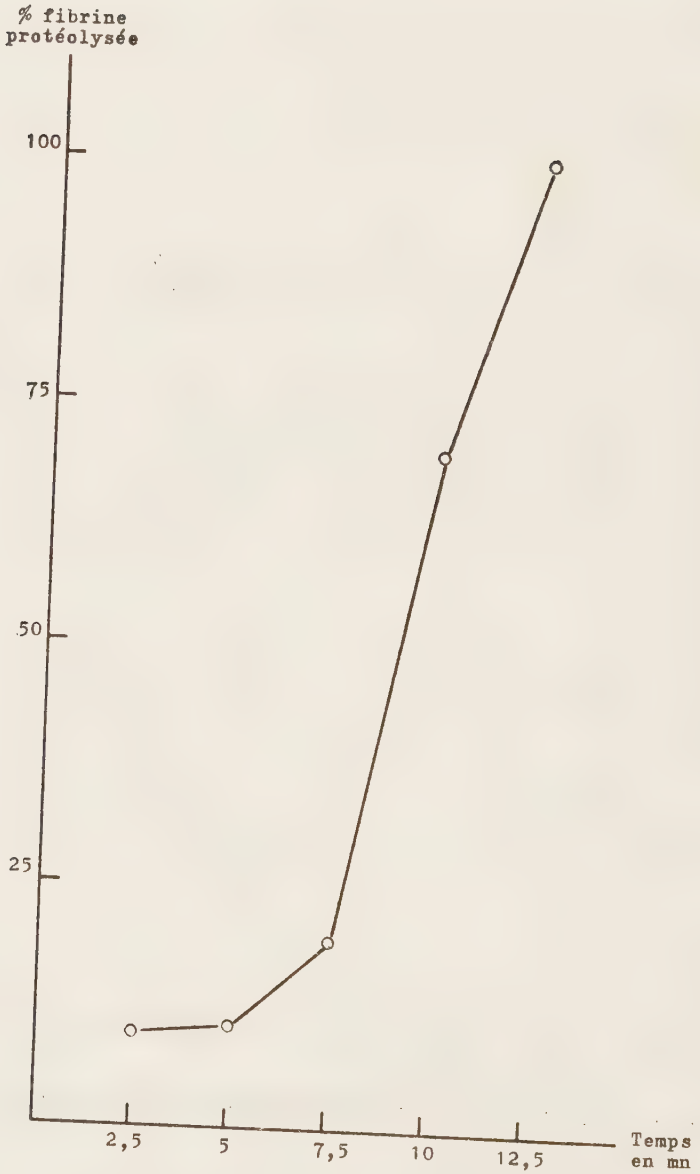


FIG. 53. — Courbe cinétique de la fibrinolyse par la plasmine Novo.

de 1,25 mg d'enzyme, la courbe cinétique de la réaction (*figure* 53) est très voisine de celle obtenue sur la même quantité de fibrinolysine Merck (*cf. figure* 52).

b) Effet de la plasmine après incubation préalable avec le fibrinogène. Fibrinogénolyse et fibrinolyse.

Cet essai a été réalisé avec la fibrinolysine Merck. Le protocole suivi est identique à celui décrit dans le paragraphe précédent pour une dose de plasmine de 125 µg. La seule différence est l'incubation intervenant entre l'addition de la plasmine et celle de la thrombine.

Au cours de cette incubation, une partie du fibrinogène présent est protéolysé, ce qui réduit d'autant la quantité de fibrine susceptible de se former dans le milieu après addition de thrombine. Cette quantité est mesurée et on en déduit, par différence avec le taux de fibrinogène coagulable initial, le pourcentage du fibrinogène protéolysé.

Dans le *tableau* XXXIX figurent les variations de ce pourcentage en fonction du temps d'incubation. Ce tableau montre que la fibrinogénolyse devient mesurable après 10 minutes d'incubation et croît rapidement entre 10 et 30 minutes.

TABLEAU XXXIX

POURCENTAGE DE FIBRINOGÈNE PROTÉOLYSÉ PAR LA FIBRINOLYSINE MERCK EN FONCTION DU TEMPS

Temps d'incubation (en minutes)	Pourcentage de fibrinogène protéolysé
0	0 %
5	0 %
10	0 %
15	56,6 %
20	61,2 %
30	95,5 %
35	100 %

c) *Détermination de l'activité fibrinolytique sur une préparation purifiée de fibrinogène exempt de plasminogène.*

Au cours de l'étude de la fibrinolyse au thrombo-élastographe, nous avons été amenés à purifier le fibrinogène afin d'en éliminer le plasminogène présent dont l'activité propre est susceptible d'entacher d'erreur les mesures de fibrinolyse.

Action de la plasmine sur la fibrine formée à partir du fibrinogène purifié.

Protocole.

Le mode opératoire adopté est identique à celui décrit à propos de l'étude de l'action de la plasmine sur le fibrinogène non purifié (*).

Ces essais ont été effectués simultanément avec le fibrinogène purifié et avec le produit de départ non purifié à des concentrations égales en protéines coagulables.

Résultats.

— *Fibrinolysine Merck.*

Les résultats rassemblés dans le *tableau* XL montrent que, pour des quantités d'enzyme comprises entre 312,5 µg et 6 250 µg, la fibrinolyse est nettement moins forte lorsque le substrat est le fibrinogène purifié exempt de plasminogène.

Ce résultat peut être interprété comme étant la conséquence de la présence d'un excès d'activateur (streptokinase) dans la fibrinolysine Merck, excès d'activateur qui pourrait activer le plasminogène dans le fibrinogène Armour.

— *Lysofibrine Novo.*

Les résultats obtenus dans ce cas sont pratiquement contraires aux précédents (*tableau* XLI). La fibrinolyse est beaucoup plus intense pour une même quantité d'enzyme avec le fibrinogène purifié qu'avec le fibrinogène Armour.

(*) La technique de purification du fibrinogène [402] nous a conduit à une solution contenant 0,40 pour 100 de protéines coagulables. Ces essais ont donc nécessairement dû être effectués avec une concentration en fibrinogène coagulable inférieure de moitié à la concentration précédemment utilisée.

TABLEAU XL

Pourcentages de fibrine protéolysée après 10 minutes d'action de la fibrinolysine Merck, ajoutée en quantités variables

Fibrinolysine Merck (en µg/ml)	Pourcentages de fibrine protéolysée	
	Fibrinogène Armour non purifié	Fibrinogène Armour purifié
0	0 %	0 %
312,5	20,6 %	2,3 %
1 250	100 %	3,7 %
3 125	100 %	4,4 %
6 250	100 %	11,2 %
9 375	100 %	81,0 %
12 500	100 %	100 %

Il est possible d'attribuer cette différence à la présence dans le fibrinogène commercial d'inhibiteurs de la plasmine [246].

3. **Étude de la fibrinolyse par activation du plasminogène.**

Dans les essais précédents, nous avons étudié la fibrinolyse en ajoutant au milieu soit l'enzyme purifié, soit le zymogène déjà activé. En revanche, dans le cas présent, nous nous proposons de produire l'activation du zymogène dans le milieu réactionnel lui-même.

Comme nous l'avons déjà signalé, le fibrinogène Armour contient du plasminogène. Nous déterminerons par addition de quantités variables de streptokinase les conséquences sur la fibrinolyse (cinétique) de l'activation de ce zymogène.

TABLEAU XLI

Pourcentages de fibrine protéolysée après 10 minutes d'action de la lysofibrine Novo, ajoutée en quantités variables

Lysofibrine Novo (en µg/ml)	Pourcentages de fibrine protéolysée	
	Fibrinogène Armour non purifié	Fibrinogène Armour purifié
0	0 %	0 %
210	0 %	8 %
315	0 %	19 %
420	0 %	91 %
625	0 %	100 %
840	9 %	100 %
1 040	60 %	100 %
1 250	100 %	100 %

Par ailleurs, sur le fibrinogène bovin purifié que nous avons préparé selon la méthode de Mosesson [402], nous tenterons d'établir une courbe de dosage du plasminogène par addition au substrat pur de quantités croissantes de plasminogène bovin.

a) *Effet de concentrations variables en streptokinase sur la fibrinolyse.*

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène bovin Armour à 1 pour 100 en protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 8,0 (solution contenant en outre 1 pour 100 de plasma humain).

— Solution de streptokinase (*) :
  — Solution-mère (I) à 50 000 UCh/ml.
  — Première dilution au 1/100 (II) : 500 UCh/ml.
  — Dilutions ultérieures à partir de (II).

Solution de streptokinase (II)	1	0,5	2	1	0,5
Tampon phosphate *p*H 8,0	q.s.p. 10 ml		q.s.p. 100 ml		
Conc. finale en UCh/ml	50	25	10	5	2,5

— Solution de thrombine à 5 u.M./ml de tampon phosphate *p*H 8,0.

Technique :

Dans un tube à centrifuger conique placé au bain-marie, les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant :

1,5 ml de solution de fibrinogène,
1 ml de solution de streptokinase,
1 ml de solution de thrombine.

La thrombine est introduite dans le milieu immédiatement après l'addition de streptokinase. Le mélange est maintenu au bain-marie pendant un temps d'incubation déterminé. Ce temps pour l'étude cinétique est variable. Les mesures ont été effectuées toutes les cinq minutes jusqu'à apparition d'une protéolyse totale.

Résultats.

Les courbes présentées dans la *figure* 54 montrent que la vitesse de la réaction croît avec la quantité de streptokinase introduite dans le milieu. Cette vitesse est très grande. En repérant graphiquement les temps de lyse 50 et 100 pour 100, nous avons construit les courbes de variations de ces temps de lyse en fonction de la concentration en streptokinase (*figure* 55).

(*) Streptokinase Behringwerke titrée en unités Christensen (UCh).

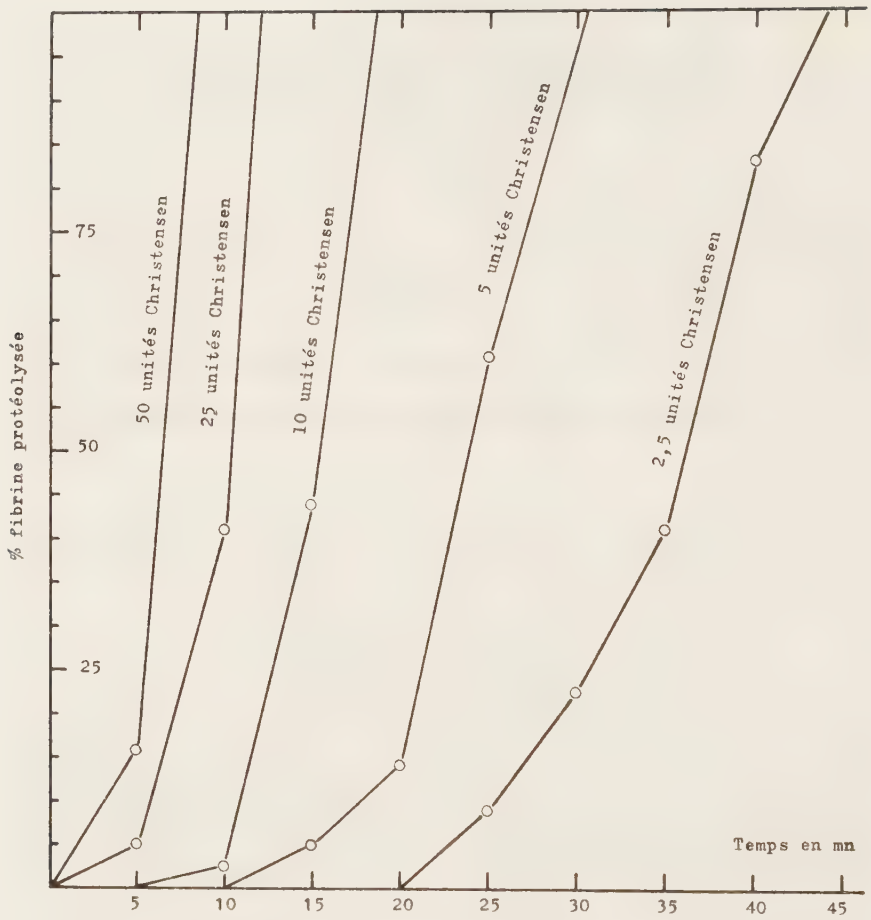


FIG. 54. — Courbes cinétiques de la fibrinolyse pour des quantités croissantes en streptokinase.

Il est intéressant de noter qu'il y a une décroissance très rapide du temps de lyse 50 pour 100 et 100 pour 100 pour des quantités de streptokinase comprises entre 2,5 et 10 unités Christensen. L'écart entre les deux courbes est assez constant et relativement faible, ce qui confirme le fait que sous l'effet de la streptokinase la vitesse de réaction est très grande.

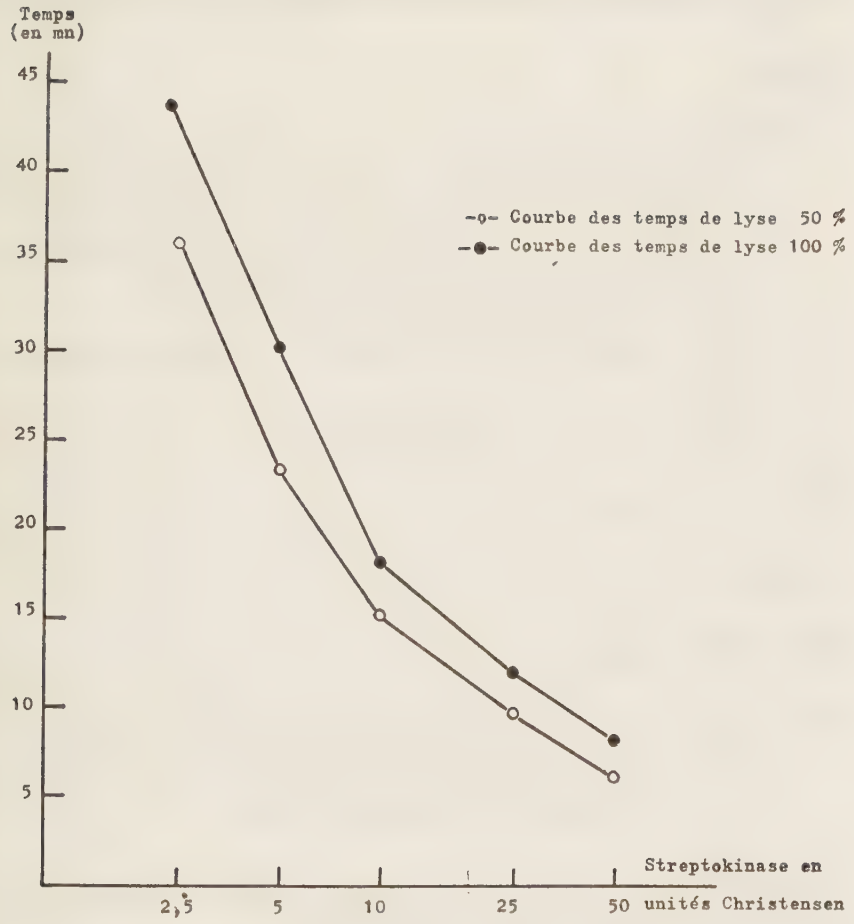


FIG. 55. — Variations des temps de lyse 50 % et 100 % en fonction de quantités croissantes en streptokinase.

b) Courbe de dosage du plasminogène contenu dans le fibrinogène bovin.

Protocole.

Réactifs :

— Solution de fibrinogène Armour (*) à 0,38 pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Solution de fibrinogène bovin Armour purifié (*) à 0,38 pour 100 de protéines coagulables dans le tampon phosphate *p*H 8,0 (fibrinogène exempt de plasminogène).

— Solution de plasminogène bovin NBC (**).

— Solution-mère à 8 mg/ml dans le tampon phosphate *p*H 8,0.

— Dilutions de la solution-mère.

Solution-mère de plasminogène bovin (ml)	7	6	5	4	3	2	1
Tampon phosphate *p*H 8,0 (ml)	1	2	3	4	5	6	7
Conc. finale en plasminogène bovin en mg/ml	7	6	5	4	3	2	1

— Solution de streptokinase Behringwerke à 150 UCh/ml.

— Solution de thrombine à 5 u.M./ml.

— Solution d'inhibiteur de protéases (***).

Technique :

Dans un tube à centrifuger conique placé au bain-marie à 37 °C sont introduits dans l'ordre suivant :

1,5 ml de solution de fibrinogène,
0,4 ml de solution de tampon phosphate *p*H 8,0,
0,5 ml de solution de plasminogène,
0,1 ml de solution de streptokinase,
1 ml de solution de thrombine.

(*) Ces solutions de fibrinogène contiennent en outre 1 pour 100 de plasma humain.
(**) NBC = Nutritional Biochemical Corporation.
(***) Fourni par l'Industrie Biologique Française S.A.,

FIG. 56. — Courbe de dosage de l'activité fibrinolytique du plasminogène (fibrinogène purifié).

Après 10 minutes d'incubation, on ajoute 1 ml de solution d'inhibiteur en mélangeant à l'aide d'un petit agitateur de

verre. La fibrine résiduelle est dosée selon la technique déjà décrite.

Résultats.

Dans la *figure* 56 est représentée la courbe d'activité du plasminogène en fonction de la concentration. L'activité fibrinolytique croît rapidement pour des quantités comprises entre 1 et 3 mg et devient totale à 3,5 mg.

Cette courbe nous a directement permis de déterminer la quantité de fibrinogène contenu dans une préparation donnée de fibrinogène Armour (lot D 8808). Dans les conditions du dosage, le pourcentage de fibrine protéolysée est pour ce produit de 26,5 pour 100. En se rapportant à la courbe, cette activité équivaut à celle de 2,28 mg de plasminogène bovin NBC. Or nous avions déterminé l'activité de ce produit exprimée en unités caséinolytiques définies selon les normes de l'Union internationale de Biochimie. Cette activité est égale à 3,81 unités/g. En conséquence, la prise d'essai du fibrinogène bovin étudié contient une quantité de plasminogène activable correspondant à $2{,}28 \times 3{,}81 \times 10^{-3}$ unités caséinolytiques.

Le fibrinogène bovin Armour (lot D 8808) contient donc en plasminogène activable l'équivalent de :

$$\frac{2{,}28 \times 3{,}81 \times 10^{-3} \times 10^{3}}{3{,}8 \times 1{,}5} = \text{unités caséinolytiques au gramme}$$

soit : 1,52 unités caséinolytiques par gramme.

D. — TABLEAU RÉCAPITULATIF DES ACTIVITÉS FIBRINOLYTIQUES DES DIFFÉRENTS ENZYMES ÉTUDIÉS

Nous avons essayé d'évaluer l'activité des enzymes en fonction des résultats obtenus sur le fibrinogène. Pour calculer leur activité fibrinolytique, nous avons construit sur papier log probit chaque courbe en portant en abscisse la concentration en enzyme et en ordonnée le pourcentage de fibrine protéolysée

trouvé au bout de 10 minutes de réaction. Le pourcentage de lyse 50 pour 100 est déterminé graphiquement. L'activité fibrinolytique de l'enzyme est calculée comme suit :

Unités fibrinolytiques/gramme d'enzyme =

$$\frac{\text{Nombre de micromoles de fibrine protéolysée}}{\text{temps (minutes)} \times \text{g d'enzyme}}$$

soit :

$$\frac{\mu\text{g de fibrine protéolysée}}{340\,000\ (*) \times 10 \times \text{g d'enzyme}}$$

Les résultats obtenus pour chacun des enzymes étudiés sur le fibrinogène purifié selon la technique de Mosesson [402] sont groupés dans le *tableau* XLII.

TABLEAU XLII

Tableau des activités fibrinolytiques trouvées pour les préparations enzymatiques utilisées (en unités internationales (u.i.) par g de produit)

Enzymes	Activité fibrinolytique* U.I./g
Fibrinolysine Merck	0,11
Lysofibrine Novo	2,45
Plasminogène NBC activé	0,29

A titre indicatif, nous avons groupé dans le *tableau* XLIII les méthodes usuelles de détermination quantitative de l'activité fibrinolytique.

(*) Poids moléculaire de la fibrine (in 68).

(*) L'unité fibrinolytique proposée se définit comme étant l'activité nécessaire dans les conditions opératoires décrites pour protéolyser une micromole de fibrine par minute.

TABLEAU XLIII

PRINCIPALES MÉTHODES QUANTITATIVES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE

Unités d'activité fibrinolytique	Concentration finale en substrat	Auteurs
Temps de lyse de 2 mn (28 °C)	0,1 pour 100 de fibrinogène bovin (cryopréparation)	GUEST et coll. (1948) [208].
Temps de lyse de 2 mn	(équivalent à la lyse de 1,1 mg de fibrine néoformée par minute)	LOOMIS (1947) [343].
Temps de lyse de 2 mn (37 °C)	0,1 pour 100 de fibrinogène bovin (cryopréparation)	CELANDER et coll. (1955) [104]. CELANDER, GUEST (1960) [102].
	0,3 pour 100 de fibrinogène humain	AMBRUS et coll. (1960) [15].
Temps de lyse de 2 mn (45 °C).	0,3 pour 100 de fibrinogène humain	MARKUS et AMBRUS (1960) [371].
Temps de lyse de 10 mn (37 °C)	0,45 pour 100 de fibrinogène bovin	CHRISTENSEN (1949) [111].
	0,1 pour 100 de fibrinogène bovin	JOHNSON, MAC CARTY (1959) [262].
	0,1 pour 100 de fibrinogène bovin	JOHNSON et coll. (1964) [263].
Quantité de fibrine protéolysée par une unité REMMERT et COHEN d'enzyme	0,08 à 0,5 pour 100 de fibrinogène humain exempt de plasminogène et d'inhibiteur	MOSESSON, FINLAYSON (1963) [403].
Quantité de caillot néoformé lysé en 24 h à 37 °C par 1 ml du même plasma contenant du p. iodobenzoate de Na	Concentration du fibrinogène plasmatique	VON KAULLA (1962) [553].
Unité Ploug modifiée	Fibrinogène bovin	PLOUG, KJELDGAARD (1957) [448].

CHAPITRE III

INTRODUCTION.

CONFRONTATION DES RÉSULTATS OBTENUS AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE ET PAR LES MÉTHODES BIOCHIMIQUES.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

INTRODUCTION

Le but que nous nous sommes fixés au cours de ce travail est de tenter de déterminer la place de la thrombo-élastographie comme méthode de mesure de la fibrinolyse.

Les résultats obtenus montrent dans leur ensemble que le thrombo-élastographe permet de déceler des variations d'ordre qualitatif et d'ordre quantitatif au cours de cette réaction enzymatique.

Il est à noter que nous avons été conduit à travailler sur deux substrats différents puisque l'un (fibrinogènes commerciaux) contient, outre le fibrinogène coagulable, du plasminogène [17], [404], du FSF, des sels minéraux et d'autres protéines (globuline antihémophilique A,...), alors que le second contient pratiquement 100 pour 100 de protéines coagulables.

DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE

A. — FIBRINO-FORMATION (FIBRINOGÈNE NON PURIFIÉ)

Nous avons vu dans la première partie de notre travail combien il était nécessaire de préciser les conditions d'obtention d'un tracé reproductible. Il importe en effet de définir la qualité du fibrinogène utilisé et d'exprimer sa concentration non pas en grammes par litre mais en fonction du taux de protéines coagulables. L'amplitude maxima des tracés varie en fonction de cette concentration. Ceci confirme les nombreux travaux qui ont mis en évidence l'influence de la concentration en fibrinogène sur l'amplitude maxima [449], [506], [507].

Quant à la thrombine, son activité se traduit par des variations des constantes r et angle α. Toutefois, r est une mesure du temps de coagulation à 15 secondes près (0,5 mm) donc assez peu sensible. L'angle α en revanche est une constante très reproductible (*tableau* XXIII) qui est, à notre avis, le principal reflet de la concentration en thrombine du milieu.

D'autre part, nous avons confirmé le rôle du FSF dans les variations d'amplitude maxima du tracé, variations déjà mises en évidence par Leroux [330].

B. — FIBRINOLYSE (FIBRINOGÈNE NON PURIFIÉ)

Les résultats obtenus au thrombo-élastographe ont permis de mettre en évidence la sensibilité de cette méthode à la nature des enzymes protéolytiques présents dans le milieu. Ces enzymes se distinguent entre eux comme l'indique le *tableau* XLIV.

1. Streptokinase.

Les résultats présentés dans le chapitre II nous permettent de constater que, en présence du plasma humain (proactivateur) [113], [394], la streptokinase provoque une fibrinolyse visible

TABLEAU XLIV

Lysofibrine Novo	= Plasmine porcine
Fibrinolysine Merck	= Plasmine humaine + activateur (SK)
Streptokinase Behringwerke	= Activateur d'origine bactérienne
Trypsine Armour Chymotrypsine Armour	= Enzymes protéolytiques d'origine pancréatique contenant trypsine, chymotrypsine et autres peptidases

sur le tracé thrombo-élastographique de toutes les préparations commerciales de fibrinogène bovin que nous avons pu étudier. Ceci constitue une preuve de la présence de plasminogène dans ces préparations.

Au cours de notre travail, nous avons vérifié que la présence d'une faible quantité de plasma est indispensable et que l'addition de streptokinase seule au milieu ne donne pas de tracé de fibrinolyse [9], [410], [538].

Le plasma humain apporterait, conformément à l'opinion de certains auteurs, un proactivateur [204], [323], [409]. Il convient de préciser que d'autres auteurs, tels Sherry et Alkjaersig [493], Kline et Fishman [284] et Gross et coll. [205], n'admettent pas l'individualité du proactivateur et pensent, soit que la streptokinase ressemble à la forme circulante de l'activateur tissulaire [493], soit que son comportement s'explique par une différence de réactivité des plasminogènes humain et bovin [284]. Néanmoins, la variation du taux de proactivateur chez l'homme [385] plaide en faveur de l'existence propre de ce facteur.

En traçant sur papier logarithmique la courbe des temps de lyse thrombo-élastographique (*figure* 57) en fonction de la concentration en streptokinase, nous obtenons une droite dont la pente est négative et présente une valeur absolue de 0,4. Le temps de lyse thrombo-élastographique est donc dans le cas

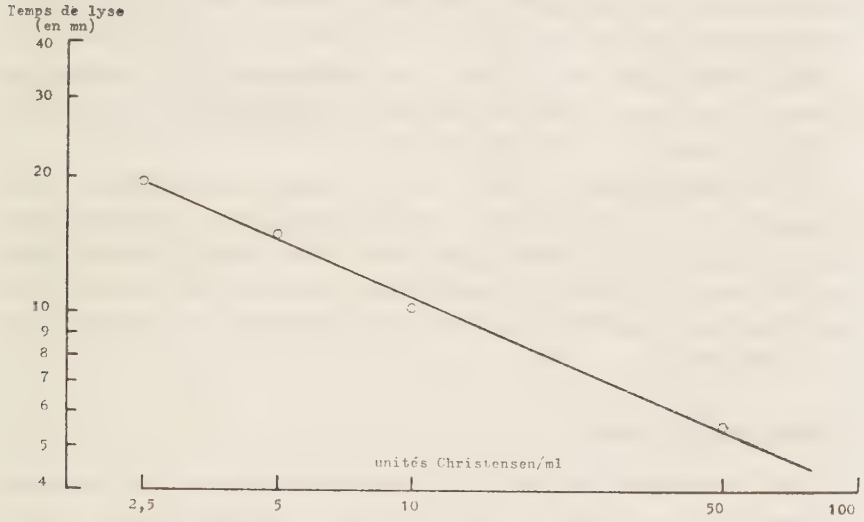


Fig. 57. — Variations des temps de lyse thrombo-élastographiques en fonction des concentrations en streptokinase.

présent inversement proportionnel à la concentration en streptokinase. Cette relation linéaire a déjà été observée par Astrup et Egeblad [29] qui l'expriment par l'équation suivante :

$$\log t = - a \log c + b$$

c = Concentration en streptokinase.
t = Temps de lyse.
a = Pente de la droite.
b = Constante égale à la valeur d'ordonnée pour une abscisse nulle.

2. **Lysofibrine Novo.**

L'action de cette préparation de plasmine sur le fibrinogène Poviet (0,8 pour 100 de protéines coagulables) se traduit, comme le montrent les tracés thrombo-élastographiques, par une fibrinolyse qui augmente très fortement pour une très faible différence de concentration. Il en résulte, en portant sur papier logarithmique

les temps de lyse thrombo-élastographiques et les concentrations en enzymes, une droite de très forte pente (— 19,0) (*figure* 58).

Le même essai réalisé sur une préparation de fibrinogène Armour (0,4 pour 100 de protéines coagulables) donne une droite de pente (— 5,6) (*figure* 58).

Il est intéressant de noter que la concentration en enzyme nécessaire pour obtenir des tracés de lyse est nettement plus élevée dans le cas du fibrinogène Poviet que dans le cas du fibrinogène Armour. Dans ce dernier cas, en effet, la concentration en protéines coagulables des solutions utilisées est moitié celle de la précédente.

3. **Fibrinolysine Merck.**

Les expériences décrites au chapitre II mettent en évidence l'action de cet enzyme sur deux solutions de fibrinogène bovin : solution de fibrinogène Poviet (0,8 pour 100 de protéines coagulables) et solution de fibrinogène Armour (0,4 pour 100 de protéines coagulables). Les droites obtenues sur papier logarithmique (temps de lyse thrombo-élastographiques en fonction de la concentration) sont de faible pente (— 0,6 et — 0,5) (*figure* 59).

Il est à noter que ces pentes sont voisines de celles obtenues précédemment avec la streptokinase et par contre très différentes de celles données par la lysofibrine (*tableau* XLV). Ceci s'explique très bien par le fait que la fibrinolysine Merck est une préparation de plasmine riche en streptokinase alors que la lysofibrine ne contient pas d'activateur.

L'activation du plasminogène bovin serait due, selon Blatt et coll. [61], à la formation d'un complexe par association moléculaire entre la plasmine et la streptokinase, complexe capable de convertir le plasminogène bovin en plasmine.

Cependant, dans le cas présent, il pourrait tout simplement se produire une activation par la présence de proactivateur dans la fibrinolysine d'origine humaine.

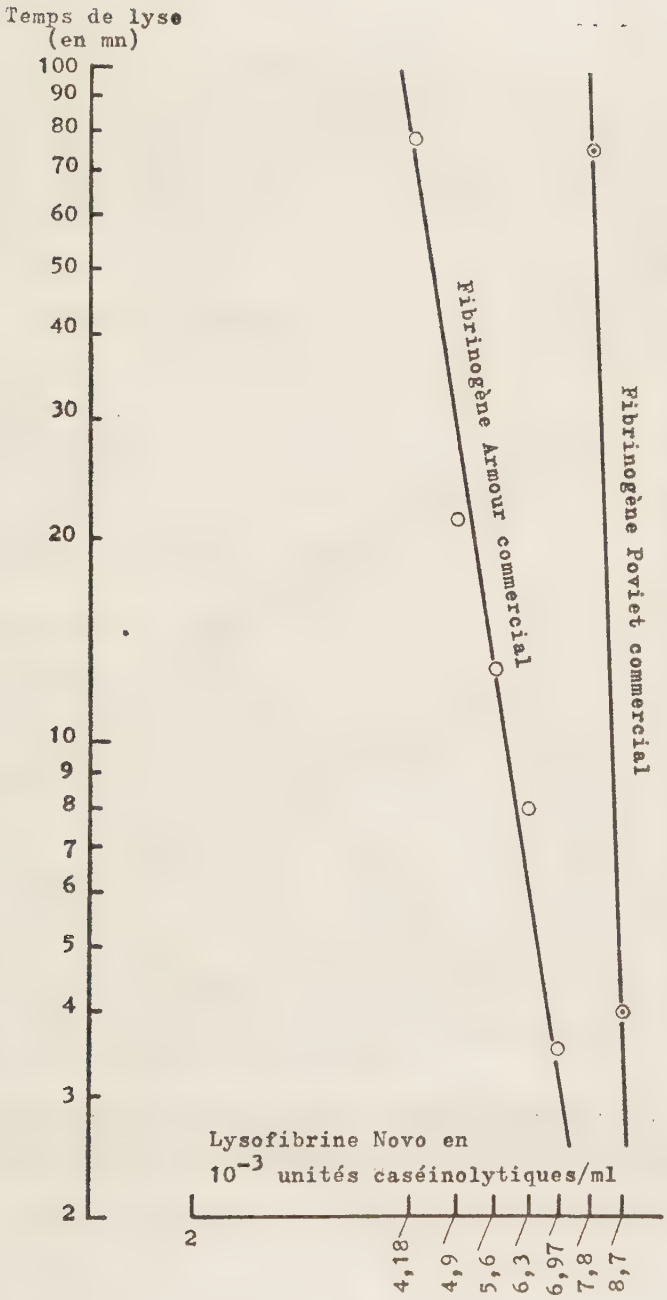


FIG. 58. — Variations des temps de lyse thrombo-élastographiques, en fonction des concentrations en lysofibrine Novo, de la fibrine néoformée à partir de solutions de fibrinogènes commerciaux.

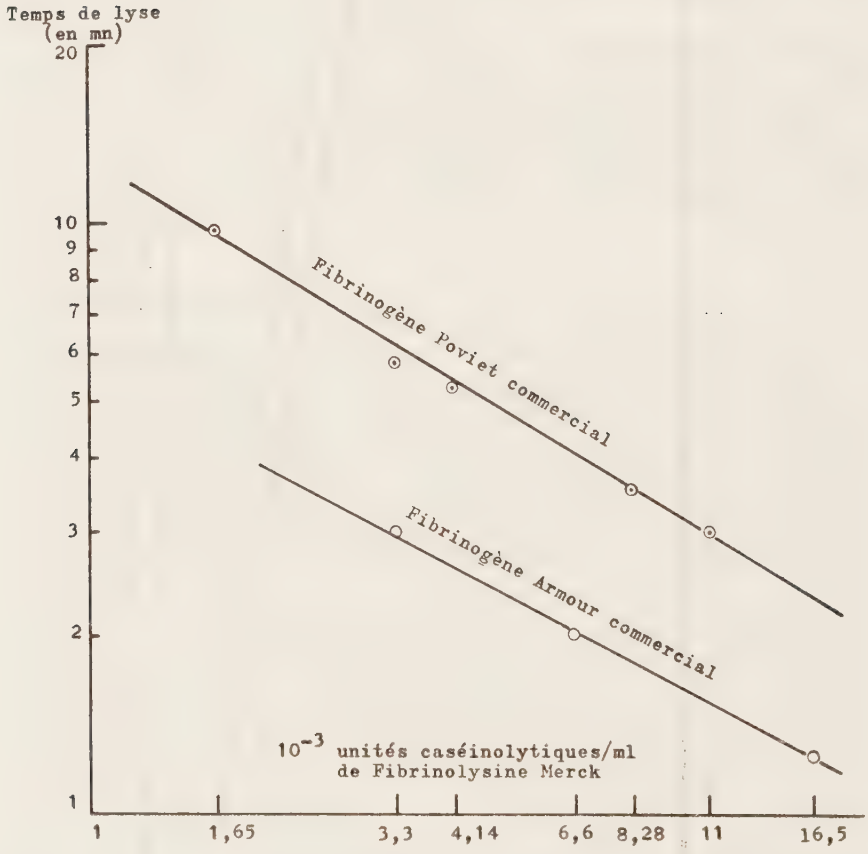


FIG. 59. — Variations des temps de lyse thrombo-élastographiques, en fonction des concentrations en fibrinolysine Merck, de la fibrine néoformée à partir de solutions de fibrinogènes commerciaux.

TABLEAU XLV

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES PENTES DES DROITES OBTENUES LORS DES VARIATIONS DES TEMPS DE LYSE THROMBO-ÉLASTOGRAPHIQUES EN FONCTION DES CONCENTRATIONS EN ENZYMES LYTIQUES DANS UN SYSTÈME DE COORDONNÉES LOGARITHMIQUES

Solutions d'enzyme	Fibrinogène	
	Poviet (*)	Armour (**)
Streptokinase	— 0,4	—
Lysofibrine Novo	— 10,0	— 5,6
Fibrinolysine Merck	— 0,6	— 0,5

(*) 0,8 pour 100 de protéines coagulables.
(**) 0,4 pour 100 de protéines coagulables.

4. **Chymotrypsine Armour.**

Cherchant à analyser les résultats obtenus avec la chymotrypsine, comme nous venons de le faire pour les plasmines et la streptokinase, nous obtenons, en portant sur papier logarithmique les temps de lyse thrombo-élastographiques ainsi que les concentrations, une droite de forte pente (— 3,0), ce qui signifie, comme précédemment, qu'à une faible différence de concentration en enzyme correspond une grande différence de temps de lyse thrombo-élastographique (*figure* 60).

Le fait de mesurer l'activité fibrinolytique de cet enzyme sur un caillot néoformé, au moyen du thrombo-élastographe, permet de mettre en évidence un pouvoir fibrinolytique relativement proche de celui de la plasmine.

Si l'on considère que la chymotrypsine présente une activité caséinolytique par gramme environ 10^3 fois supérieure à celle de la lysofibrine Novo (*), il est très intéressant de noter que pour parvenir à un temps de lyse thrombo-élastographique de

(*) cf. *tableau* XXXII.

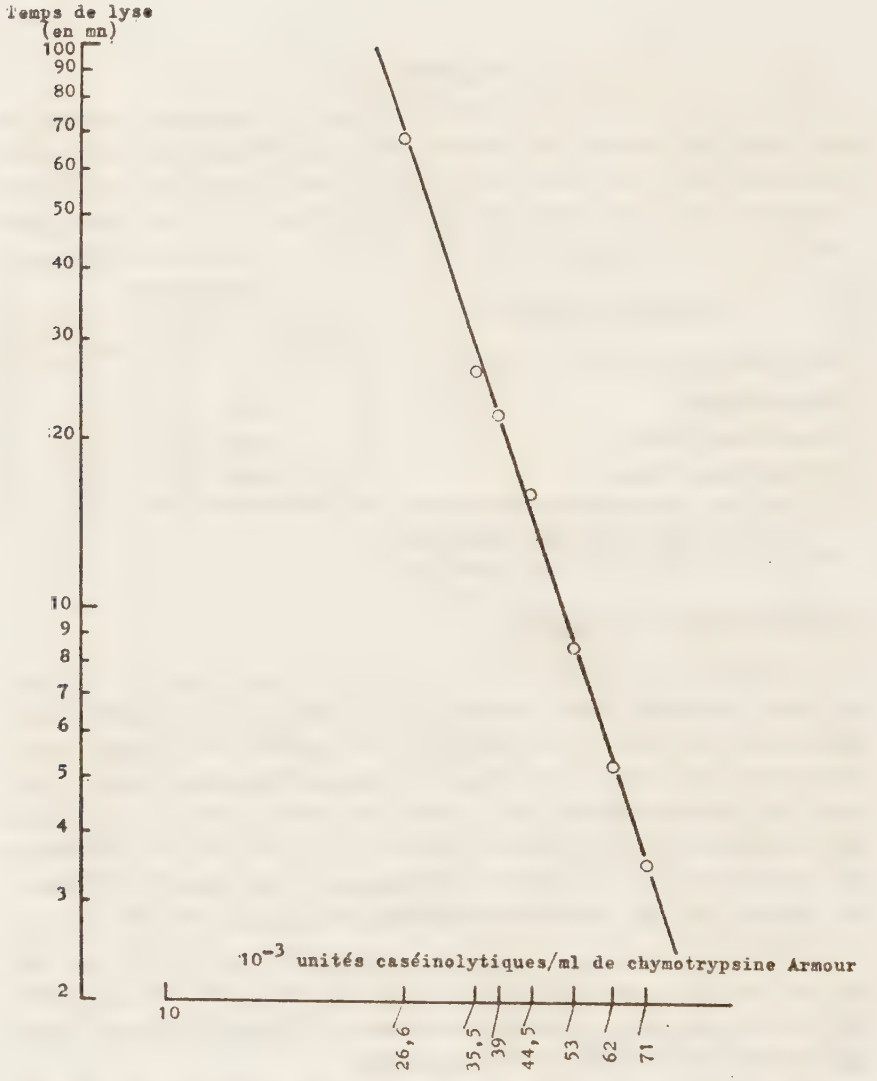


FIG. 60. — Variations des temps de lyse thrombo-élastographiques, en fonction des concentrations en chymotrypsine Armour, de la fibrine néoformée à partir d'une solution de fibrinogène commercial.

100 minutes, le rapport exprimé en unités caséinolytiques de la concentration en chymotrypsine sur la concentration en lysofibrine est égal à 3.

Si la chymotrypsine semble trois fois moins active que la lysofibrine en comparant les concentrations exprimées en unités caséinolytiques, il n'empêche que, en les comparant pondéralement, la chymotrypsine a une action fibrinolytique environ 3×10^2 fois supérieure à l'activité de la lysofibrine.

5. **Trypsine Armour.**

Le retard de coagulation du fibrinogène dû à la trypsine, mis en évidence par de nombreux auteurs [7], [44], [332], a été confirmé par notre étude.

En effet, si une addition de chymotrypsine à $8{,}89 \cdot 10^{-2}$ unités caséinolytiques/ml (10 µg/ml) ne modifie pas les caractéristiques du tracé, l'apport de trypsine à $6{,}62 \cdot 10^{-2}$ unités caséinolytiques/ml (10 µg/ml) provoque un allongement très sensible du temps de coagulation qui augmente de 1 minute (2 mm) à 2 minutes 30 (5 mm). L'amplitude est elle-même perturbée et ne dépasse pas 9,5 mm (*cf. figure* 42) au lieu d'atteindre une valeur normale de 26 mm.

D'autre part, l'action fibrinolytique de la chymotrypsine n'est décelable qu'à partir d'une solution à $17{,}79 \cdot 10^{-2}$ unités caséinolytiques/ml. Or, dans le cas de la trypsine, dès un apport de solution enzymatique titrant $13{,}24 \cdot 10^{-2}$ unités caséinolytiques/ml, aucune coagulation ne se fait déjà plus.

Ceci laisse à penser que la trypsine, dont l'action sur un substrat de fibrine a été par ailleurs reconnue, ne manifeste pas d'activité fibrinolytique suffisante dans le cas d'une étude thrombo-élastographique faute d'une nécessaire coagulation par attaque prématurée de certaines liaisons du fibrinogène le rendant coagulable trop lentement [7], [44], [332].

C. — FIBRINOLYSE (FIBRINOGÈNE PURIFIÉ)

La purification du fibrinogène présente un certain nombre de difficultés, tenant principalement aux risques de dénaturation de la protéine et de la solubilisation du produit obtenu.

Nos premiers essais de purification nous avaient conduit à des produits donnant un tracé de trop faible amplitude par rapport à la concentration en protéines coagulables utilisée. Ultérieurement, la réalisation de toutes les manipulations à basse température a permis d'éviter ces modifications. Le produit obtenu est de préférence conservé en solution au congélateur car nous avons constaté, comme l'ont déjà signalé Masure et coll. [373], que la lyophilisation perturbe non seulement la solubilité du fibrinogène mais également les propriétés dynamiques du caillot (diminution de *am*).

L'utilisation du fibrinogène purifié dans l'étude thrombo-élastrographique de la fibrinolyse nous conduit à des résultats nettement différents de ceux obtenus avec le fibrinogène non purifié.

1. **Fibrinolysine Merck.**

Avec cet enzyme qui est, rappelons-le, un plasminogène humain activé par un excès de streptokinase, les temps de lyse thrombo-élastographiques sont nettement augmentés lorsque le substrat est du fibrinogène purifié. Ceci se traduit sur papier logarithmique par une droite (*figure* 61) dont la pente est de — 1,0, alors que sur le fibrinogène Armour non purifié la pente est de — 0,5. Il est à noter que la valeur de pente — 1,0 est voisine de celle trouvée par Astrup et Egeblad [29] pour l'activité d'une plasmine sur un fibrinogène purifié. En revanche, la valeur de pente — 0,5 correspond selon ces mêmes auteurs et également d'après nos résultats à l'action de la streptokinase sur un fibrinogène riche en plasminogène.

Il est possible d'interpréter ces résultats de la façon suivante : sur un fibrinogène non purifié, la fibrinolysine Merck, riche en streptokinase, donne une série de tracés thrombo-élastographiques traduisant une double action : action propre de la plasmine et action résultant de l'activation du plasminogène, présent dans le substrat, par l'excès de streptokinase. En revanche, l'activité de la fibrinolysine Merck sur un fibrinogène purifié

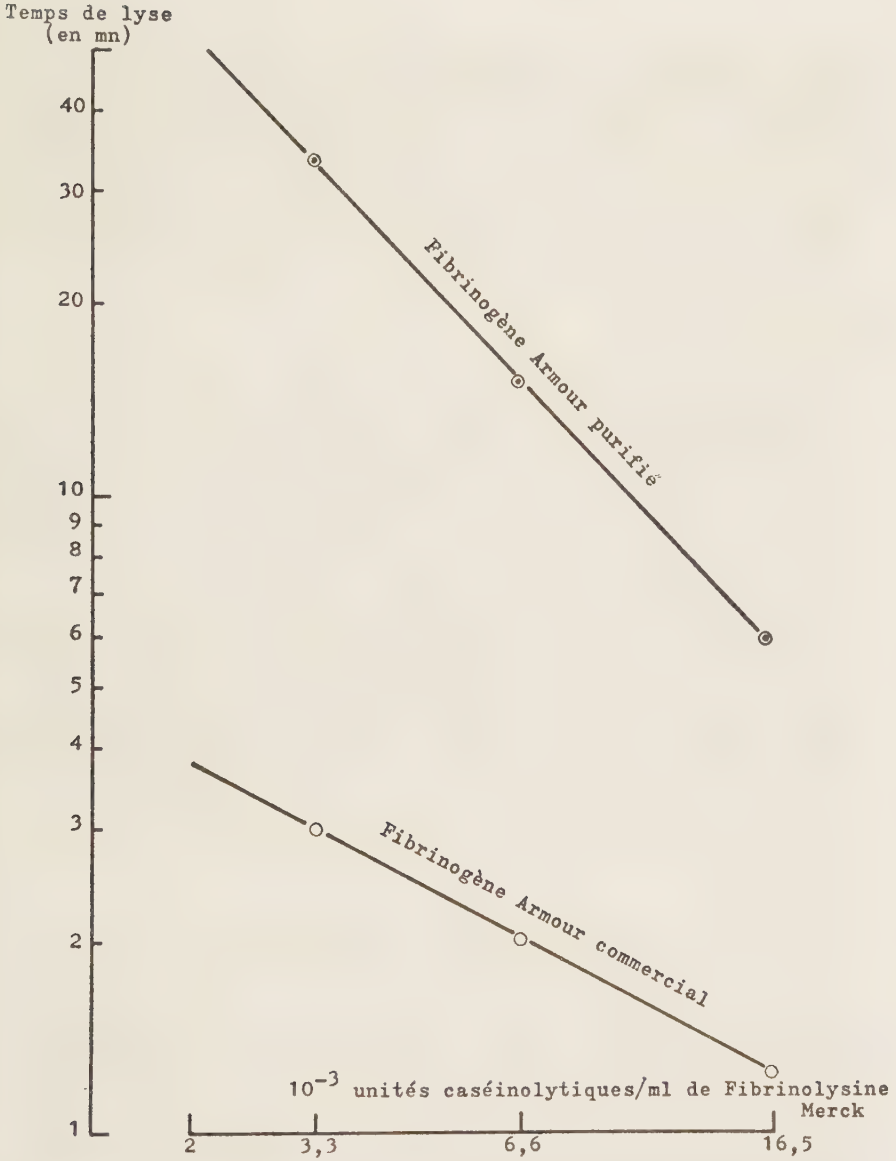


FIG. 61. — Variations des temps de lyse thrombo-élastographiques, en fonction des concentrations en fibrinolysine Meck, de la fibrine néoformée à partir de solutions de fibrinogène de teneur identique en protéines coagulables.

semble être limitée à la propre action de la plasmine sur le substrat. Cette activation du plasminogène bovin par la streptokinase serait dans ce cas particulier rendue possible soit par la présence de proactivateur plasmatique dans la fibrinolysine Merck d'origine humaine, soit, comme le pensent Blatt et coll. [61], par la formation d'un complexe entre la plasmine et la streptokinase, capable de convertir le plasminogène bovin en plasmine.

2. **Lysofibrine Novo.**

Dans le cas de cet enzyme, les résultats obtenus montrent une différence d'action sur les deux fibrinogènes (purifié et non purifié) inverse de la précédente. En effet, la fibrinolyse est plus accentuée si l'on utilise le fibrinogène purifié. Ceci se traduit sur papier logarithmique (*figure* 62) par une droite de pente — 1,8, résultat voisin de celui trouvé par Astrup [29]. Dans les mêmes conditions, dans le cas du fibrinogène non purifié, la pente est de — 5,6. La moindre sensibilité de ce fibrinogène à la lysofibrine Novo pourrait être attribuée à la présence d'une antiplasmine déjà signalée, précisément dans le cas du fibrinogène Armour, par Hawkey et Stafford [246]. Il est intéressant d'ailleurs de rappeler que Fletcher [182] a montré qu'il existe dans le plasma humain une quantité d'antiplasmine supérieure de 60 pour 100 à la quantité de plasminogène (donc de plasmine potentielle).

3. **Activité plasminique à unités caséinolytiques égales.**

Astrup et Egeblad [29], [159] ont trouvé que des plasmines purifiées de différentes origines présentent une activité fibrinolytique et une activité caséinolytique identiques. La spécificité d'espèce ne peut donc être mise en cause. La meilleure action de la plasmine porcine purifiée Novo, par rapport à la plasmine humaine Merck, serait sans doute due à un phénomène d'inhibition de la plasmine humaine Merck par la streptokinase présente en excès.

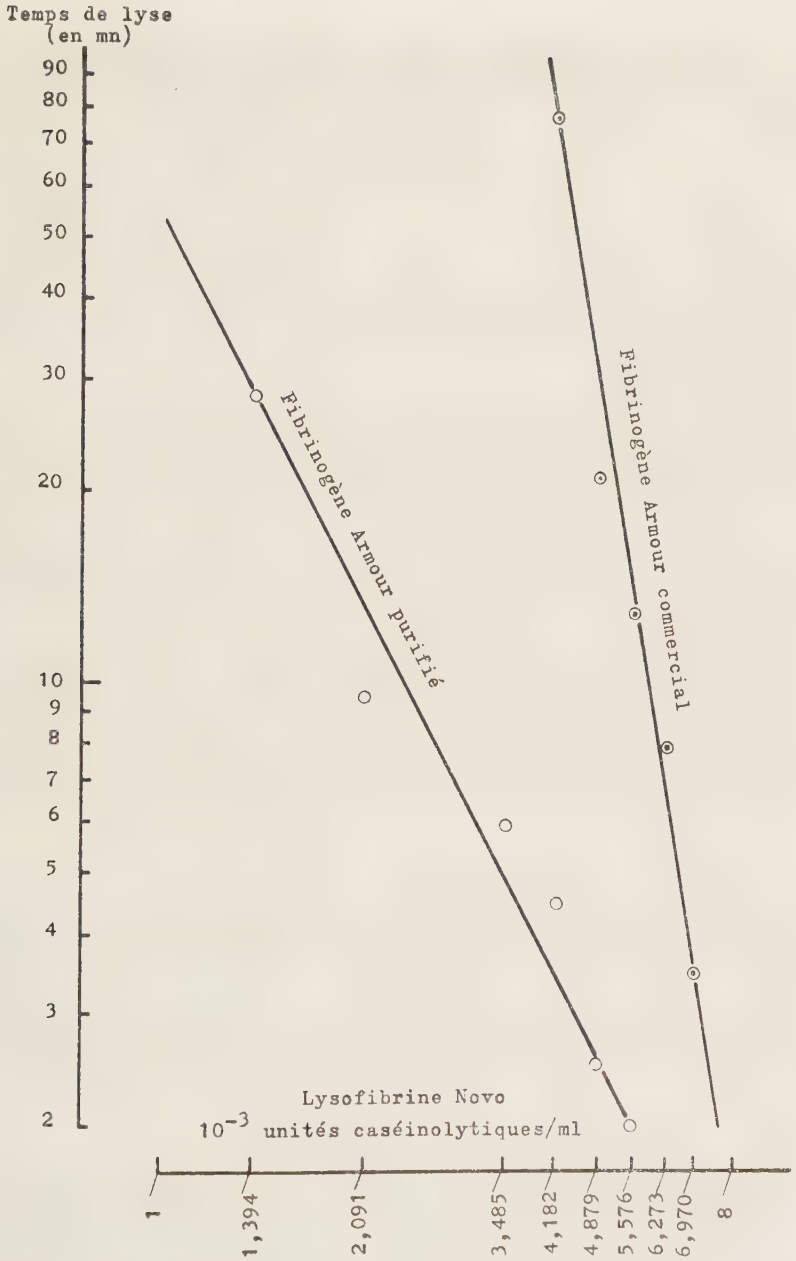


FIG. 62. — Variations des temps de lyse thrombo-élastographiques en fonction des concentrations en lysofibrine Novo, de la fibrine néoformée à partir de solutions de fibrogène de teneur identique en protéines coagulables.

CONFRONTATION DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LA MÉTHODE BIOCHIMIQUE

A. — FIBRINO-FORMATION

Alors que les constantes du tracé thrombo-élastographique varient très nettement en fonction des concentrations en thrombine, la quantité de fibrine réellement formée au bout de 30 minutes ne varie plus à partir d'une concentration en thrombine de 0,250 u.M./ml.

Pour la concentration de 0,125 u.M./ml, il n'y a pas de coagulation visible au thrombo-élastographe alors que nous trouvons dans les mêmes conditions qu'il existe déjà, au bout de 30 minutes, 75 pour 100 du fibrinogène à l'état de fibrine. Ceci met bien en évidence le fait important que l'amplitude du thrombo-élastographe est bien plus en rapport avec les propriétés dynamiques du caillot qu'avec la quantité de fibrine formée.

Ce terme de « propriétés dynamiques » du caillot a été discuté par Leroux [330] qui, critiquant le concept d'« élasticité » de Hartert [220] admis par De Nicola [134] ou de « résistance mécanique » de Gagliardi [195], Mazzetti [375], Von Kaulla [554] et Beller [49], pense que l'amplitude maxima est une fonction inverse des capacités de déformation de la structure fibrineuse.

Il est en outre intéressant de noter que cette concentration en thrombine de 0,125 u.M./ml, qui ne provoquait pas de coagulation au thrombo-élastographe, devient une dose active (*am* × 3,5 mm après 120 minutes) en présence d'un excès de calcium. Pourtant, dans ces conditions, la quantité de fibrine formée au bout de 30 minutes était restée sensiblement la même.

B. — FIBRINOLYSE

Bien que la thrombo-élastographie ait été déjà proposée pour étudier la fibrinolyse [28], [29], [61], [159], [160], elle conduit à des résultats qui ne semblent pas avoir été encore confrontés

avec ceux que donne la mesure des mêmes réactions dans des conditions aussi voisines que possible par une méthode biochimique. C'est ce que nous nous proposons de faire dans l'exposé suivant, au cours duquel nous comparerons les mesures thrombo-élastographiques et biochimiques.

1. Cinétique de la réaction.

Nous trouvons dans la partie expérimentale de notre travail des mesures de fibrinolyse pratiquées au thrombo-élastographe d'une part et par la méthode biochimique d'autre part avec le même enzyme (fibrinolysine Merck) aux mêmes concentrations ($3{,}31 \cdot 10^{-4}$ et $33{,}12 \cdot 10^{-4}$ unités caséinolytiques au ml) et avec le même substrat (0,8 pour 100 de protéines coagulables).

En comparant la variation de l'amplitude du tracé en fonction du temps et la variation du pourcentage de fibrine protéolysée en fonction du temps, nous obtenons les valeurs rassemblées dans la *figure* 63. Ces résultats montrent que, pour la faible concentration en plasmine, l'amplitude atteint sa valeur minima alors que le taux de fibrine n'a pratiquement pas changé. En revanche, pour une plus forte concentration en enzyme, la chute rapide de l'amplitude correspond à une protéolyse déjà importante du substrat.

Ainsi au temps de lyse du diagramme, il semblerait que plus la concentration en enzyme est élevée plus le pourcentage de fibrine protéolysée est lui-même grand. En conclusion, l'apparence de lyse totale donnée par le tracé ne correspond absolument pas à une protéolyse réelle de 100 pour 100 du substrat, et, bien au-delà du temps de lyse thrombo-élastographique, il reste dans le milieu une quantité de fibrine non négligeable. Ce fait, qui mérite d'être particulièrement souligné, tend à montrer que la méthode thrombo-élastographique mesure la dépolymérisation de la fibrine alors que le dosage biochimique suit la réaction de protéolyse jusqu'à la fragmentation en peptides de poids moléculaires inférieurs.

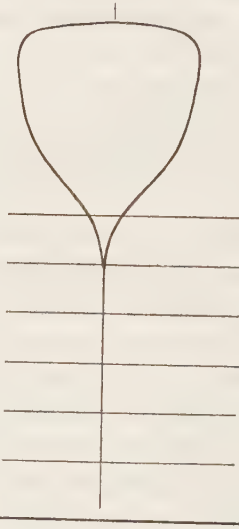
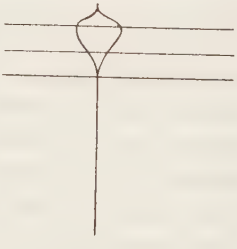
Concentration de la solution enzymatique (unités caséinolytiques/ml)	Thrombo-élastogramme	Amplitude	% fibrine protéolysée
$3,31 \cdot 10^{-4}$	 20 mn 25 mn 30 mn 35 mn 40 mn 45 mn	5,5 0 0 0 0 0	0 9,3 18 46,3 90 100
$33,12 \cdot 10^{-4}$	 2,30 mn 5 mn 7,30 mn	8,5 3,5 0	20,3 31,2 100

FIG. 63. — Action de la fibrinolysine Merck sur un substrat de fibrine néoformée.

2. **Influence de la préparation enzymatique utilisée.**

a) Lysofibrine Novo.

Nous avons analysé les résultats obtenus au thrombo-élastographe et par la méthode biochimique avec la lysofibrine Novo (*figure* 64). Les résultats rassemblés dans ce diagramme montrent que, comme pour la fibrinolysine Merck, le temps de lyse thrombo-élastographique ne correspond en fait qu'à une protéolyse très partielle du substrat, qui ne devient totale que bien plus tardivement. En outre, on peut noter que la mesure de l'amplitude à 10 mm de l'origine sur un tracé (soit au bout de 5 minutes) donne une valeur de 6 mm pour une concentration de 87,12 · 10^{-4} unités caséinolytiques/ml en lysofibrine Novo, alors qu'elle est de 1 mm pour une concentration de 33,12 . 10^{-4} UC (*)/ml en fibrinolysine Merck. Ceci confirme à nouveau l'activité plus forte de ce dernier enzyme, attribuable à la présence de streptokinase activant le plasminogène présent dans le substrat. Cette conclusion déjà formulée par l'étude d'une

Concentration de la solution enzymatique (unités caséinolytiques/ml)	Thrombo-élastogramme	Amplitude	% fibrine protéolysée
87,12 · 10^{-4}	5 mn	6	9,8
	10 mn	0	19,2
	15 mn	0	69,7
	20 mn	0	100

Fig. 64. — Action de la lysofibrine Novo sur un substrat de fibrine néoformée.

(*) UC = unités caséinolytiques.

constante longitudinale (temps de lyse thrombo-élastographique) se retrouve par l'étude d'une constante transversale (amplitude).

b) *Streptokinase Behringwerke.*

La confrontation des résultats obtenus au thrombo-élastographe et par la méthode biochimique (*figures* 65, 66 et 67) montrent que la streptokinase conduit à des tracés de lyse qui ne correspondent en fait qu'à une protéolyse très partielle du

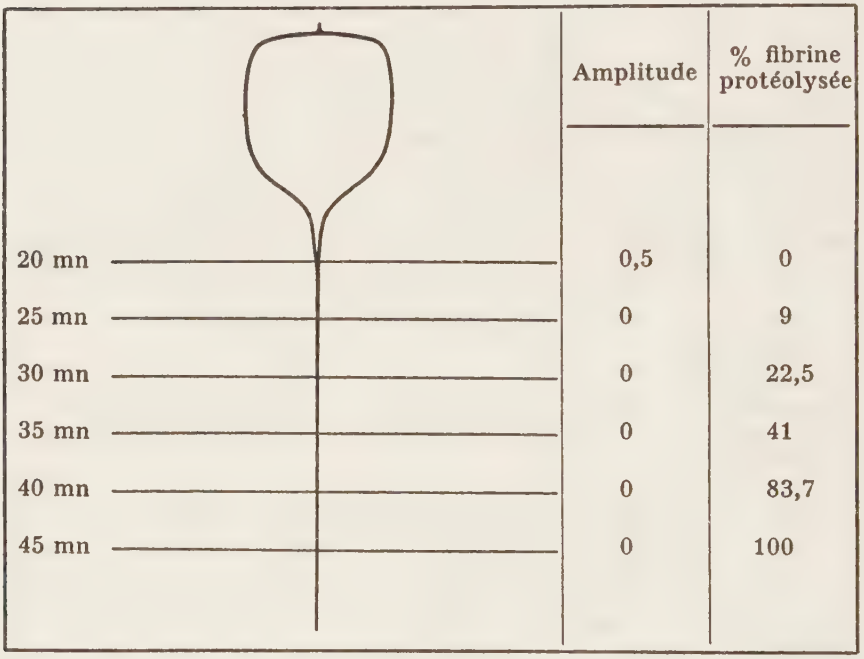
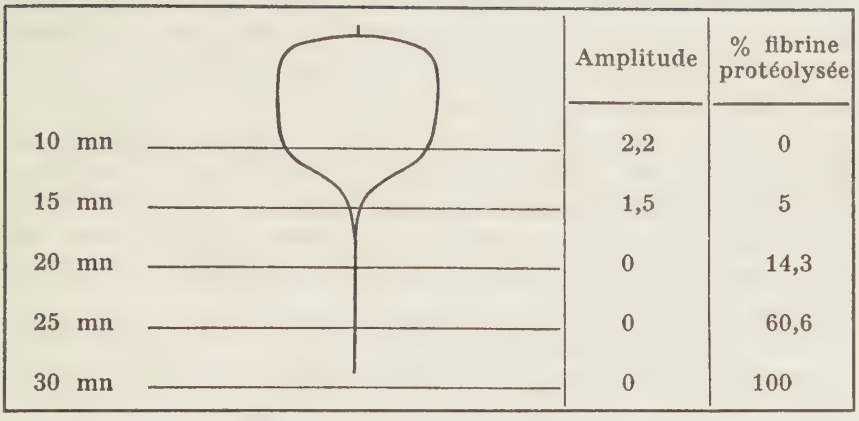


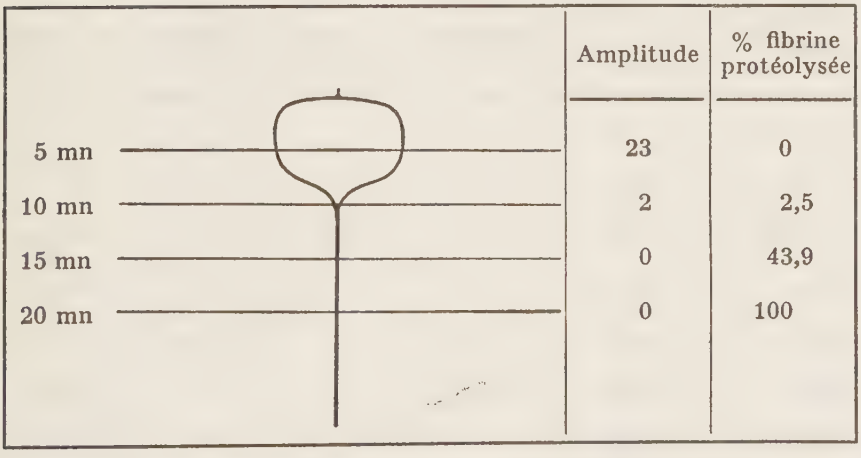
Fig. 65. — Action de la streptokinase (2,5 unités Christensen/ml) sur nu substrat de fibrine néoformée.

substrat. Comme précédemment, le temps de lyse thrombo-élastographique ne coïncide pas avec une protéolyse à 100 pour 100 de la fibrine.



	Amplitude	% fibrine protéolysée
10 mn	2,2	0
15 mn	1,5	5
20 mn	0	14,3
25 mn	0	60,6
30 mn	0	100

FIG. 66. — Action de la streptokinase (5 unités Christensen/ml) sur un substrat de fibrine néoformée.



	Amplitude	% fibrine protéolysée
5 mn	23	0
10 mn	2	2,5
15 mn	0	43,9
20 mn	0	100

FIG. 67. — Action de la streptokinase (10 unités Christensen/ml.) sur un substrat de fibrine néoformée.

3. **Variations en fonction de la concentration en enzyme.**

Après avoir mesuré sur les tracés thrombo-élastographiques les valeurs de l'amplitude à 10 minutes (20 mm), pour différentes doses de chacune des plasmines utilisées (fibrinolysine Merck, lysofibrine Novo), nous comparons ces résultats à ceux obtenus également au bout de 10 minutes par la détermination biochimique du pourcentage de fibrine résiduelle après protéolyse. Ces résultats sont rassemblés dans les *tableaux* XLVI et XLVII. Nous constatons une variation dans le même sens de l'amplitude des tracés et du pourcentage de fibrine restante au bout de 10 minutes de réaction.

Ainsi par exemple, pour une concentration de $165{,}62 \cdot 10^{-4}$ UC/ml de fibrinolysine Merck, nous trouvons, avec du fibri-

TABLEAU XLVI

TABLEAU COMPARATIF DES ACTIVITÉS FIBRINOLYTIQUES AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE ET PAR LA MÉTHODE BIOCHIMIQUE

Fibrinolysine Merck µg/ml	Activité caséinolytique 10^{-4} U.C./ml	Fibrinogène non purifié		Fibrinogène purifié	
		Amplitude à 10 mn	% fibrine résiduelle	Amplitude à 10 mn	% fibrine résiduelle
31,25	0,82	11	—	11	—
250	6,62	0	—	7	—
312,5	8,28	0	79,4	—	97,7
1 250	33,12	0	0	6	96,3
2 500	66,25	0	0	2,5	—
3 125	82,81	0	0	—	95,6
6 250	165,62	0	0	1	88,8
9 375	248,43	0	0	—	19,0
12 500	331,25	0	0	0	0

nogène purifié au bout de 10 minutes, une amplitude de 1 mm alors qu'il reste 88,8 pour 100 de la fibrine initiale. Pour une concentration faible (0,82 · 10^{-4} UC/ml), l'amplitude est de 11 mm et le taux de fibrine résiduelle voisin de 100 pour 100.

TABLEAU XLVII

TABLEAU COMPARATIF DES ACTIVITÉS FIBRINOLYTIQUES AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE ET PAR LA MÉTHODE BIOCHIMIQUE

Lysofibrine Novo µg/ml	Activité caséinolytique 10^{-4} U.C./ml	Fibrinogène non purifié		Fibrinogène purifié	
		Amplitude à 10 mn	% fibrine résiduelle	Amplitude à 10 mn	% fibrine résiduelle
100	6,96	—	100	5	—
200	13,93	—	100	4	—
210	14,63	—	100	—	92
300	20,90	—	100	1,5	—
315	21,95	—	100	—	81
420	29,27	—	100	—	9
500	34,84	6	100	0,5	—
600	41,81	4,5	100	0	—
625	43,56	—	100	0	0
700	48,78	3	—	0	0
800	55,75	2,5	—	0	0
840	58,54	—	91	0	0
900	62,72	1,5	—	0	0
1 000	69,69	0	—	0	0
1 040	72,48	0	40	0	0

Dans l'ensemble de ces résultats, il n'y a pas de proportionnalité entre l'amplitude et le taux de fibrine résiduelle, mais il semble toutefois que l'amplitude soit une constante thromboélastographique sensible à la fibrinolyse puisque, toujours en prenant le même exemple, une augmentation du taux de fibrine protéolysée de 2,3 pour 100 à 11,2 pour 100 correspond à une diminution de l'amplitude de 7 mm à 1 mm.

D'autre part, il semble bien que le temps de lyse thromboélastographique, dans les conditions expérimentales et à 10 minutes, corresponde à un pourcentage de fibrine protéolysée jamais supérieur à 20 pour 100 et que l'on peut estimer raisonnablement aux environs de 10 pour 100.

Enfin, les différences observées entre les plasmines au thromboélastographe se trouvent confirmées par les méthodes biochimiques (*tableaux* XLVI et XLVII).

*

* *

COROLLAIRE

Une des applications possibles de l'emploi de la méthode thrombo-élastographique dans la mesure de l'activité fibrinolytique est la détermination de cette activité dans le plasma humain, dosage dont l'intérêt clinique est évident.

La présence d'inhibiteurs de la fibrinolyse dans le plasma [194], [431] a conduit la plupart des auteurs à procéder à la mesure de l'activité fibrinolytique du plasma humain sur la fraction de protéines dites euglobulines plasmatiques, séparées par modification du *p*H, soit à l'aide d'acide acétique [89], [298], [394], soit par passage d'un courant de gaz carbonique [556].

L'activité de cette fraction est habituellement mesurée soit par son temps de lyse « lyse des euglobulines » [62], [122], [304], [394], [423], [554], [560], soit par la surface de lyse après dépôt sur un plateau de fibrine — plateaux de fibrine d'Astrup — [30], [64], [408], [556].

L'étude de l'activité fibrinolytique des euglobulines a été envisagée par Cacciola et coll. en 1960 [91]. Cette méthode utilisant une préparation de fibrinogène commercial est fondée sur la mesure des variations de l'amplitude du tracé. Compte tenu de l'ensemble des observations auxquelles nous a conduit notre travail, nous avons tenté de procéder à un essai du même type en utilisant d'une part un fibrinogène riche en plasminogène et d'autre part un fibrinogène purifié exempt de plasminogène.

Le protocole adopté est le suivant :

1. Séparation de la fraction euglobulinique du plasma selon la méthode de Von Kaulla [556] [in 469] et mise en solution de cette fraction dans un volume de tampon (*) égal à son volume initial de plasma.

2. Préparation de dilutions de la solution d'euglobulines (1/10 à 1/100).

3. Dans la cuve du thrombo-élastographe, sont introduits successivement :

— 0,15 ml de solution de fibrinogène à 0,8 pour 100 de protéines coagulables,
— 0,10 ml de dilutions d'euglobulines,
— 0,10 ml d'une solution contenant la streptokinase (25 UCh/ml) et la thrombine (5 u.M./ml).

Ces essais ont été réalisés à partir d'un mélange de plasma humain provenant de sujets normaux.

Sur les différents tracés obtenus nous avons mesuré le temps de lyse élastographique. Ces résultats portés sur papier logarithmique figurent dans la *figure* 68. Ils montrent une proportionnalité directe entre la concentration en euglobulines du milieu et le temps de lyse thrombo-élastographique.

En outre, en comparant les courbes obtenues avec le fibrinogène commercial Armour, riche en plasminogène, et avec le fibrinogène, exempt de plasminogène, nous constatons une différence importante. La lyse est plus intense lorsque l'on utilise un substrat de fibrine formé à partir de fibrinogène riche en plasminogène que lorsque l'on emploie le fibrinogène exempt de plasminogène.

Cet essai tend à montrer que les résultats auxquels nous a conduit notre travail, à l'aide de préparations de plasmine, pourraient être utilisés pour une mesure thrombo-élastographique de l'activité des euglobulines plasmatiques. Comme dans nos

(*) Tampon phosphate *p*H 7,4.

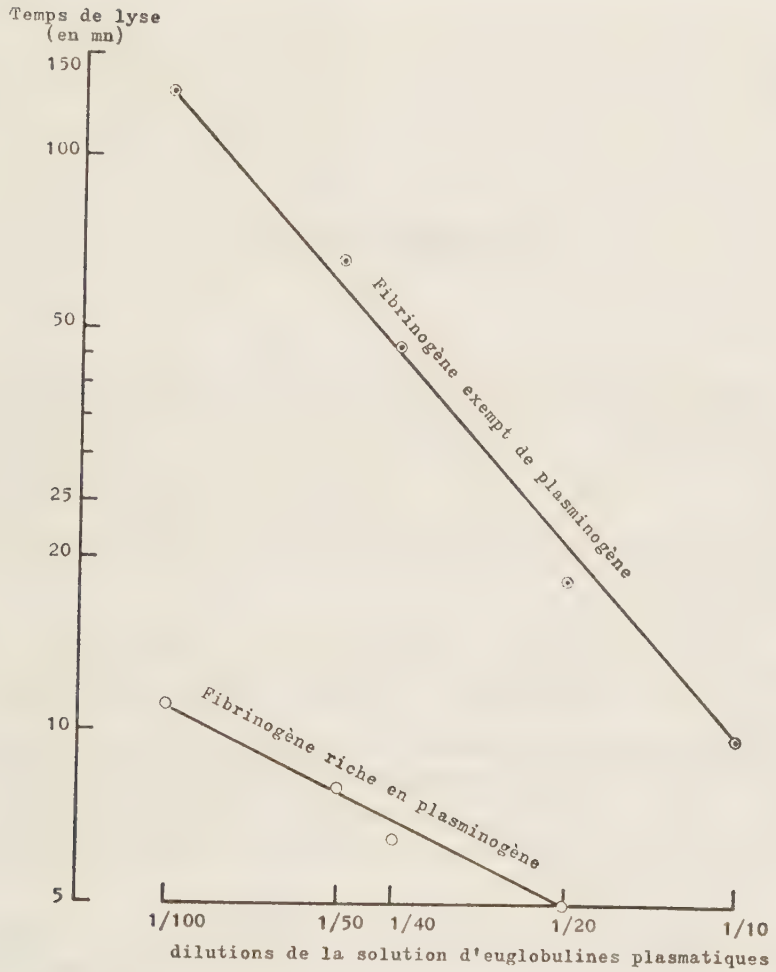


FIG. 68. — Variations du temps de lyse thrombo-élastographique en fonction de dilutions de solutions d'euglobulines plasmatiques.

essais précédents la pureté du fibrinogène constitue un élément très important de cette mesure. Le temps de lyse thrombo-élastographique nous paraît constituer une variable à retenir dans l'appréciation des tracés.

CONCLUSION

Au cours du présent travail, nous avons étudié deux réactions : la première, due à l'action de la thrombine sur le fibrinogène, est une protéolyse partielle suivie d'une polymérisation de la fibrine ; la seconde, due à l'action d'enzymes protéolytiques sur la fibrine, est une dépolymérisation par protéolyse allant jusqu'à la formation de produits de dégradation stables vis-à-vis de la plasmine.

Nous avons constaté que ces deux réactions peuvent être mesurées aussi bien par un dosage biochimique de la fibrine que par leur enregistrement à l'aide d'un thrombo-élastographe.

Notre travail nous a amené à constater des différences dans les résultats donnés par les deux méthodes et à préciser la signification des constantes du tracé thrombo-élastographique. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous conduit aux conclusions suivantes :

1. L'action de la thrombine sur le fibrinogène se traduit au thrombo-élastographe par un tracé, essentiellement caractérisé par deux constantes : l'angle α (ou sa tangente) et l'amplitude maxima (*am*).

Nous avons montré que l'angle α varie directement en fonction de la quantité de thrombine présente dans le milieu. Cette constante diminue encore pour de faibles doses de thrombine, contrairement à l'amplitude maxima qui atteint pour ces mêmes doses des valeurs paradoxalement plus élevées.

L'amplitude maxima (*am*) varie proportionnellement à la quantité de substrat présent dans le milieu. Il faut entendre par substrat la quantité réelle de protéines coagulables contenues dans les différentes préparations de fibrinogènes commerciaux utilisés. Cette quantité est très variable, comme le montre le dosage des protéines coagulables dans ces produits.

L'analyse des tracés nous montre que la formation de fibrine sous l'action de la thrombine est une réaction très rapide. Les temps de coagulation (constante *r*) sont très courts et ne varient de façon significative que par modification du *p*H (cf. détermination du *p*H optimum de fibrino-formation). En outre, l'addition de calcium améliore les propriétés dynamiques du caillot en augmentant la valeur de la constante *am*, sans influencer la quantité de fibrine formée, comme le montrent les dosages biochimiques effectués en parallèle.

Il est intéressant de noter d'autre part que la thrombo-élastographie, dans le cas de l'étude de la fibrino-formation répond bien à la mise en évidence des phénomènes enzymatiques liés au rapport $\frac{\text{enzyme}}{\text{substrat}}$. Nous avons vu en effet que la constante α répondait à une augmentation relative de la quantité de substrat de la même façon qu'à une diminution dans des proportions inverses de la quantité d'enzyme.

En définitive, nous pouvons considérer la constante α comme l'expression de la vitesse de la fibrino-formation. L'amplitude maxima, quant à elle, traduit non seulement la quantité de substrat transformé mais encore et surtout les *propriétés physiques* dynamiques du caillot de fibrine.

2. L'action des enzymes protéolytiques, introduits dans la solution de fibrinogène avant l'addition de thrombine, modifie le tracé thrombo-élastographique en provoquant un rapprochement des branches du diapason.

Nous avons retenu deux constantes caractéristiques de l'enregistrement de la fibrinolyse : la tangente de l'angle de lyse

(tangente Θ) et le temps de lyse (Tl). Nous avons constaté que la forme du tracé diffère selon que l'on introduit dans le milieu un enzyme protéolytique (plasmine ou chymotrypsine) ou un activateur du plasminogène (streptokinase). Dans le premier cas, la diminution de l'amplitude est progressive et les branches du diapason présentent une forme convexe. Dans le second cas, la diminution de l'amplitude est brusquement rapide et les branches du diapason présentent une forme concave.

Il est ainsi possible au thrombo-élastographe de différencier la fibrinolyse par un enzyme protéolytique de celle produite par un activateur de la lyse. Dans le cas de l'utilisation de la streptokinase comme activateur, le fait dominant est l'existence, démontrée par les dosages biochimiques, d'un temps de latence d'autant plus grand que la dose d'activateur est plus faible. Ce temps de latence se retrouve sur les tracés thrombo-élastographiques de fibrinolyse sous l'action de la streptokinase.

Le tracé thrombo-élastographique met également en évidence le phénomène de fibrinogénolyse, phénomène susceptible en précédant la fibrinolyse d'entraîner une erreur dans la mesure de cette réaction. L'élément caractéristique de la fibrinogénolyse est le fait que son augmentation s'accompagne d'une diminution corrélative des angles de coagulation (α) et de lyse (Θ). En l'absence de fibrinogénolyse, l'augmentation de la fibrinolyse se traduit par une diminution de l'angle de coagulation (α), alors que l'angle de lyse (Θ) augmente.

Nous avons constaté au cours de notre travail qu'il existe une proportionnalité entre le temps de lyse, mesuré sur le tracé thrombo-élastographique, et l'activité fibrinolytique des enzymes protéolytiques présents dans le milieu. Pour chaque enzyme protéolytique, la droite obtenue, dans un système de coordonnées logarithmiques, présente une pente négative et de valeur absolue plus élevée s'il s'agit d'un enzyme (plasmine, chymotrypsine) que s'il s'agit d'un activateur (streptokinase).

3. La confrontation des résultats obtenus au thrombo-élastographe et par des dosages biochimiques de la fibrine nous conduit aux observations suivantes :

L'évolution du tracé thrombo-élastographique n'est pas le reflet exact de la cinétique de la réaction. En effet, nous avons trouvé au temps de lyse thrombo-élastographique (écartement 2 mm) des taux de fibrine résiduelle supérieurs à 80 pour 100 de la quantité de fibrine initialement formée.

Le tracé thrombo-élastographique de fibrinolyse est réduit à une droite, à un moment où la réaction enzymatique est encore pratiquement à son début. Il convient donc de souligner ce fait, que le thrombo-élastographe enregistre principalement la disparition des propriétés dynamiques du caillot qui précède la protéolyse réelle du substrat.

L'enregistrement thrombo-élastographique de la fibrinolyse est particulièrement sensible à la pureté du substrat et de l'enzyme utilisé. La présence de plasminogène dans le fibrinogène utilisé, de même que la présence de streptokinase dans certaines plasmines, se traduisent dans nos études thrombo-élastographiques et biochimiques par une activité fibrinolytique surajoutée. Nous avons montré que l'on peut mesurer par dosage biochimique la quantité de plasminogène présent dans les préparations commerciales de fibrinogène et que ces préparations peuvent être convenablement purifiées.

Enfin, la comparaison des résultats thrombo-élastographiques et biochimiques obtenus avec une plasmine purifiée, sur le fibrinogène commercial et sur le fibrinogène pur, nous a conduit à confirmer l'existence d'une antiplasmine dans les préparations commerciales de la fraction I de Cohn (fibrinogène Armour).

En définitive, la méthode thrombo-élastographique est une méthode physique qui peut figurer parmi les méthodes quantitatives de mesure de la fibrinolyse mais son extrême sensibilité nécessite dans chaque cas une définition très précise des conditions de la réaction.

Sur un plan plus général, il nous paraît remarquable de pouvoir mesurer quantitativement la fibrinolyse par une méthode qui n'est pas directement en rapport avec les modifications moléculaires dues à l'action de l'enzyme sur le substrat. Ceci nous paraît être dû au fait que dans le cas de la fibrinolyse les modifications moléculaires de la fibrine, postérieures à la lyse thrombo-élastographique, sont étroitement liées aux modifications physiques du substrat.

*
* *

BIBLIOGRAPHIE

[1] Abildgaard U. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1965, **17**, 529.

[2] Ablondi F.B. et De Renzo E.C. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1959, **102**, 717.

[3] Ablondi F.B. et Hagan J.J. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1958, **99**, 769.

[4] Ablondi F.B., Hagan J.J., Philips M. et De Renzo E.C. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **82**, 153.

[5] Ackers G.K. — *Biochemistry*, 1964, **3**, 723.

[6] Alagille D. et Soulier J.P. — *Sem. Hôp. Paris*, 1956, **32**, 355.

[7] Alexander B., Rimon A et Katchalski E. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1966, **16**, 507-25.

[8] Alkjaersig N., Fletcher A.P. et Sherry S. — *J. Biol. Chem.* 1958, **233**, 81.

[9] Alkjaersig N., Fletcher A.P. et Sherry S. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 86.

[10] Alkjaersig N., Fletcher A.P. et Sherry S. — *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 832.

[11] Alkjaersig N., Fletcher A.P. et Sherry S. — *J. Clin. Invest.*, 1959, **38**, 1086.

[12] Alkjaersig N., Fletcher A.P. et Sherry S. — *J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 917.

[13] Allington M.J. — *Nature*, 1968, **217**, 375.

[14] Ambrus J.L. — *Feder. Proc.*, 1966, **25**, 28.

[15] Ambrus J.L., Ambrus C.M., Sokal J.E., Markus G., etc. — *Amer. J. Cardiol.*, 1960, **6**, 462.

[16] Amery A., Vermylen J., Maes H. et Verstraete M. — in : « VII[e] Congrès international de Thérapeutique, Genève, 6-8 octobre 1961. Les enzymes en thérapeutique. Rapports et communications », Genève, Editions Médecine et Hygiène, 1962.

[17] Ardry R. — *Biol. Méd.*, 1955, **44**, 698.

[18] Ardry R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1960, **18**, 485.

[19] Astrup T. — *Acta Physiol. Scand.*, 1944, **7**, Suppl. 21, 121 p.

[20] Astrup T. — *Advances in Enzymology*, 1950, **10**, 1-49.

[21] Astrup T. — *Abstr. 18th Internat. Physiol. Congr., Copenhagen*, 1950, p. 81.

[22] Astrup T. — *Acta Physiol. Scand.*, 1952, **26**, 243.

[23] Astrup T. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1953, **2**, 347.

[24] Astrup T. — *Blood*, 1956, **11**, 781.

[25] Astrup T. — *Feder. Proc.*, 1966, **25**, 42.

[26] Astrup T. et Alkjaersig N. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **37**, 99.

[27] Astrup T., Brackman F., Ollendorff P. et Rasmussen J. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1960, **5**, 329.

[28] Astrup T., Cro kston J. et Macintyre A. — *Acta Physiol. Scand.*, 1950, **21**, 238.

[29] Astrup T. et Egeblad K. — *Amer. J. Physiol.*, 1965, **209**, 84.

[30] Astrup T. et Muellertz S. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **40**, 346.

[31] Astrup T. et Permin P.M. — *Nature*, 1947, **159**, 681.

[32] Astrup T. et Sterndorff I. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1952, **81**, 675.

[33] Astrup T et Sternorff I. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1955, **7**, 239.

[34] Audier M., Serradimigni A. et Bondil L. — *Marseille Méd.*, 1960, **97**, 477-88.

[35] Aymerich D.F., Massa J.F. et Velasquez B.L. — *Arch. Inst. Farmacol. Exper.*, 1951, **3**, 11.

[36] Badgy D., Guba F., Lorand L. et Milhalyi E. — *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1948, **1**, 197.

[37] Bagdy D. et Szara I. — *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1953, **4**, 229.

[38] Bagdy D. et Szara I. — *Acta Physicol. Acad. Sci. Hung.*, 1955, **7**, 179.

[39] Bailey K. — *Adv. Protein. Chem.*, 1944, **1**, 310.

[40] Bailey K. et Bettelheim F.R. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **18**, 495.

[41] Bailey K. et Bettelheim F.R. — *Brit. Med. Bull.*, 1955, **11**, 50.

[42] Bailey K. Bettelheim F.R., Lorand L. et Middlebrook W.R. — *Nature*, 1951, **167**, 233.

[43] Bang N.U. — Ultrastructure of the Fibrin Clot, in : « Blood Clotting Enzymology » (Seegers, W.H., ed.), New York et London *Academic Press Inc.*, 1967, p. 487-549.

[44] Bar-Eli A. et Katchalski E. — *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, 1690.

[45] Barnhart M.I. et Anderson G.F. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1962, **110**, 734.

[46] Barnhart M.I. et Riddle J.M. — *Blood*, 1963, **21**, 306.

[47] Baughman D.J. et Waugh D.F. — *Abstr. Proc. 10th Ann. Meet. Biophys. Soc., Boston*, 1966, 100.

[48] Beck F., Schmultzer R. et Duckert F. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1963, **10**, 106.

[49] Beller F.K. — in : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 38-41, 85-7, 121-4, 151-2.

[50] Benhamou E. et Griguer P. — *Presse méd.*, 1956, **64**, 2157.

[51] Berg R.L., et Field R.A. — *J. Clin. Invest.*, 1954, **33**, 1572.

[52] Berg W. et Korsan-Bengsten K. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1963, **9**, 151.

[53] Bergstroem K., Blombaeck B. et Kleen G. — *Acta Med. Scand.*, 1960, **168**, 291.

[54] Bergstroem K. et Wallen P. — *Arkiv Kemi*, 1961, **17**, 503.

[55] Bertrand H., Coupier J. et Raby C. — *Hémostase*, 1965, **5**, 207-17.

[56] Bettelheim F.R. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **19**, 121.

[57] Bettelheim F.R. et Bailey K. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, **2**, 578.

[58] Bickford A.F. et Sokolow M. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1961, **5**, 480.

[59] Bidwell E. — *Biochem. J.*, 1953, **55**, 497.

[60] Billimoria J.D., Drysdale J., James D.C.O. et Mac Lagan N.F. — *Lancet*, 1959, II, 471.

[61] Blatt W.F., Gray J.L., et Jensen H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, **11**, 85.

[62] Blix S. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1961, **13**, Suppl. 58, 19 p.

[63] Blix S. — *Acta Med. Scand.*, 1962, **171**, 83.

[64] Blix S. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1962, **14**, 528.

[65] Blix S. — *Acta Med. Scand.*, 1964, **176**, 649.

[66] Blombaeck B. — *Acta Chem. Scand.*, 1956, **10**, 147.

[67] Blombaeck B. — *Arkiv. Kemi*, 1958, **12**, 99.

[68] Blombaeck B. — Fibrinogen to Fibrin Transformation, in : « Blood Clotting Enzymology » (Seegers, W.H., ed.), New York et London, *Academic Press Inc.*, 1967, p. 143-215.

[69] Blombaeck B. et Blombaeck M. — *Arkiv Kemi*, 1956, **10**, 415.

[70] Blombaeck B., Blombaeck M., Edman P. et Hessel B. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, **115**, 371.

[71] Blombaeck B., Blombaeck M., Groendahl N.J. et Holmberg E. — *Arkiv Kemi*, 1966, **25**, 411.

[72] Blombaeck B., Blombaeck M., Laurent T.C. et Persson H. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **97**, 171.

[73] Blombaeck B., Blombaeck M. et Nilsson I.M. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1957, **1**, 76.

[74] Blombaeck B., Bostrom H. et Vestermark A. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **38**, 502.

[75] Blombaeck B. et Doolittle R.F. — *Acta Chem. Scand.*, 1963, **17**, 1816.

[76] Blombaeck B. et Groendahl N.J. — 1966, non paru, cité dans 68.

[77] Blombaeck B. et Laurent T.C. — *Arkiv Kemi*, 1958, **12**, 137.

[78] Blombaeck B., Sjoequist J. et Wallen P. — *Acta Chem. Scand.*, 1959, **13**, 819.

[79] Blombaeck B. et Vestermark A. — *Arkiv Kemi*, 1958, **12**, 173.

[80] Blombaeck B. et Yamashina I. — *Arkiv Kemi*, 1958, **12**, 299.

[81] Blombaeck M. — *Acta Paediat.*, 1958, **47**, Suppl. 114.

[82] Boehm P. et Baumeister L. — *Klin. Wochschr.*, 1955, **33**, 712.

[83] Boomgaard J., Deggeller K., Bleyenberg A. et Vreeken J. — *Clin. Chim. Acta*, 1966, **13**, 498.

[84] Boudreaux H.B. et Frampton V.L. — *Nature*, 1960, **185**, 409.

[85] Bowman H.S. et Yelito M.B. — *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 1957, **74**, 670.

[86] Brand E. et Edsall J.T. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1947, **16**, 223.

[87] Breddin K. — in : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 36-8, 84-5, 124-6, 147-51.

[88] Brown M.E. et Rothstein F. — *Science*, 1967, **155**, 1017.

[89] Buluk K. et Januszko J. — *Pathol. Polska*, 1957, **8**, 107.

[90] Buluk K., Januszko J. et Olbromski J. — *Nature*, 1961, **191**, 1093.

[91] Cacciola E., Fichera C. et Ferrauto A. — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1960, **36**, 1307.

[92] Cacciola E., Fichera C. et Ferrauto A. — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1960, **36**, 1313.

[93] Capet-Antonini F. — *Nouv. Rev. Franç. Hématol.*, 1963, **3**, 585.

[94] Capet-Antonini F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1966, **48**, 989.

[95] Carter J.R. et Warner E.D. — *Amer. J. Physiol.*, 1954, **179**, 549.

[96] Caspary E.A. — *Biochem. J.*, 1956, **62**, 507.

[97] Caspary E.A. et Kerwick R.A. — *Biochem. J.*, 1954, **56**, XXXV.

[98] Caspary E.A. et Kerwick R.A. — *Biochem. J.*, 1957, **67**, 41.

[99] Casubolo L. — La fibrinolyse au cours des cirrhoses. Aspects médicaux et chirurgicaux. Thèse Doct. Méd., Paris, 1965.

[100] Cecil R. et Wake R.G. — *Biochem. J.*, 1962, **82**, 401.

[101] Celander D.R., Dell Naschke M. et Guest M.M. — *Texas Rep. Biol. Med.*, 1961, **19**, 16.

[102] Celander D.R. et Guest M.M. — *Amer. J. Cardiol.*, 1960, **6**, 409.

[103] Celander D.R. et Guest M.M. — *Feder. Proc.*, 1960, **19**, 60.

[104] Celander D.R., Langlinais R.P. et Guest M.M. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **55**, 286.

[105] Chakrabarti R. et Fearnley G.R. — *J. Clin. Pathol.*, 1962, **15**, 228.

[106] Chakrabarti R., Fearnley G.R. et Hocking E.D. — *Brit. Med. J.*, 1964, **1**, 534.

[107] Chandrasekhar N., Osbahr A. et Laki K. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, **15**, 182.

[108] Chargaff E. et Bendich A. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **149**, 93.

[109] Christensen L.R. — *J. Gen. Physiol.*, 1945, **28**, 363, 519.

[110] Christensen L.R. — *J. Gen. Physiol.*, 1946, **30**, 149.

[111] Christensen L.R. — *J. Clin. Invest.*, 1949, **28**, 163.

[112] Christensen L.R. — « The Streptokinase-Plasminogen System in Streptococcal Infections », New York, Columbia University Press, 1954.

[113] Christensen L.R. et MacLeod C.M. — *J. Gen. Physiol.*, 1945, **28**, 363.

[114] Christensen L.R. et Smith D.H. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1950, **74**, 840.

[115] Clément W.E. et MacNichol G.P. — *J. Clin. Pathol.*, 1959, **12**, 544.

[116] Cliffton E.E. et Burchell A.R. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1961, **5**, 463.

[117] Cohen C. — *J. Polymer. Sci.*, 1961, **49**, 144.

[118] Cohn E.J., Strong L.E., Hugues Jr. W.L., etc. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 459.

[119] Colloque sur la thrombodynamographie (Clinique des maladies du sang de la Faculté de Médecine de Paris, 20 mai 1958). *Le Sang*, 1960, **31**, 65-81.

[120] Consden R. — *Discussions Faraday Soc.*, 1953, **13**, 282.

[121] Coon W.W. et Duff I.F. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1957, **51**, 381.

[122] Copley A.L. — *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 1954, **99**, 426.

[123] Cottafavi M. — in : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 109-21.

[124] Curragh E.F. et Elmore D.T. — *Biochem. J.*, 1964, **93**, 163.

[125] Dastre A. — *Arch. Physiol.*, 1893, **5**, 661.

[126] Dausset J. — *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.*, 1956, **1**, 6.

[127] Davidson F.M. — *Biochem. J.*, 1960, **76**, 56.

[128] Davies M.C. et Englert M.E. — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1011.

[129] Della Santa R. — *Praxis*, 1954, **43**, 89.

[130] Della Santa R. — Etude thrombo-élastographique des états thrombophiliques, in : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haemotalogica, 1955, p. 75-84.

[131] Della Santa R. et Duraffourd P. — Dépistage de l'état thrombophile par la méthode d'Hartert, in : Première conférence internationale sur les Thromboses et les Embolies », Bâle, Benno-Schwabe, 1954, p. 590-7.

[132] Della Santa R. et Duraffourd P. — *Schweiz. med. Wochschr.*, 1954, **84**, 1128.

[133] De Nicola P. — in : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 176-7.

[134] De Nicola P. — « Thrombelastography ». Springfield, Ill., Charles C. Thomas, 1957.

[135] De Nicola P. et Mazzetti G.M. —*Amer. J. Clin. Pathol.*, 1955, **25**, 447.

[136] De Nicola P. et Mazzetti G.M. — Studio trombelastografico dei defetti di coagulazione in : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 133-45.

[137] De Nicola P. et Mazzetti G.M. — *Blood*, 1956, **11**, 71.

[138] Denis de Commercy P.S. — « Mémoire sur le sang », Paris, J.B. Baillière et Fils, 1859.

[139] Derechin M. — *Biochem. J.*, 1961, **78**, 443.

[140] De Robertis E. — *Blood*, 1955, **10**, 528.

[141] Destaing F., Duzer A., Ferrand B. et Portier A. — *Pathol. Biol.*, 1960, **8**, 1615.

[142] Destaing F., Duzer A. et Portier A. — *Pathol. Biol.*, 1960, **8**, 1109-16, 1117-28.

[143] Deutsch E. et Elsner P. — *Amer. J. Cardiol.*, 1960, **6**, 420.

[144] Deutsch E. et Fischer M. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1960, **4**, 482.

[145] De Vreker R.A., Vermylen C. et Verstraete M. — The Purification of Thrombin for Use as a Fibrinolytically Inert Reagent, in : Protides of the Biological Fluids » (Peeters, H., ed.), Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1963, p. 343-6.

[146] Donaldson Y.H. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1964, **63**, 213.

[147] Donnelly T.H., Laskowski Jr M., Notley N. et Scheraga H. A. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **56**, 369-87.

[148] Doolittle R.F. — *Biochem. J.*, 1965, **94**, 742.

[149] Doolittle R.F., Oncley J.L. et Surgenor D.M. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 3123.

[150] Dray L. — Recherches sur le plasminogène. Mise au point d'une nouvelle méthode de dosage et application à l'étude des cirrhoses hépatiques. Thèse Doct. Pharm., Paris, 1966.

[151] Dudok de Wit. C. — *Vox sang*, 1962, **7**, 526.

[152] Dudok de Wit C., Den Ottolander G.J.H. et Krijnen H.W. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1962, **8**, 322.

[153] Dudok de Wit C., Krijnen H.W. et Den Ottolander G.J.H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1962, **8**, 315.

[154] Dupont C. — *Prod. Probl. Pharm.*, 1965, **20**, 581.

[155] Eagle H. — *J. Exptl. Med.*, 1937, **63**, 613.

[156] Eagle H. et Harris T.M. — *J. Gen. Physiol.*, 1937, **20**, 543.

[157] Edsall J.T. — *J. Polymer. Sci.*, 1954, **12**, 253.

[158] Edsall J.T., Foster J.F. et Scheinberg H.J. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 273.

[159] Egeblad K. — Inhibitors of Fibrinolysis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1967, **20**, Suppl. 98.

[160] Egeblad K., et Astrup T. — *Brit. J. Haematol.*, 1967, **13**, 10.

[161] Ehrenpreis S., Laskowski Jr. M., Donnelly T.H. et Scheraga H.A. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 4255.

[162] Ehrenpreis S., Leach S.J. et Scheraga H.A. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 6086.

[163] Ehrenpreis S. et Scheraga H.A. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **227**, 1043.

[164] Elmore D.T. et Curragh E.F. — *Biochem. J.* 1963, **86**, 98.

[165] Ende H.A. et Schultz G.U. — *Z. Physik. Chem.*, 1962, **33**, 143.

[166] Engel A. et Alexander B. — *Biochemistry*, 1966, **5**, 3590.

[167] Engel A., Alexander B. et Pechet L. — *Biochemistry*, 1966, **5**, 1543.

[168] Favre-Gilly J. — *Rev. Hématol.*, 1952, **7**, 60-71.

[169] Favre-Gilly J., Thouverez J.P. et Belleville J. — *Nouv. Rev. Franç. Hématol.*, 1965, **5**, 335.

[170] Fazal Mohammad S., Reylon D.V., Tewari K.P. et Sitharamarao D.N. — *Nature*, 1967, **216**, 384.

[171] Fearnley G.R. — *Amer. J. Cardiol.*, 1960, **6**, 371.

[172] Fearnley G.R. — *Brit. Med. Bull.*, 1964, **20**, 185.

[173] Fearnley G.R., Balmforth G. et Fearnley E. — *Clin. Sci.*, 1957, **16**, 645.

[174] Fearnley G.R. et Lackner R. — *Brit. J. Haemotol.*, 1955, **1**, 189.

[175] Fearnley G.R., Revill R. et Twee J.M. — *Clin. Sci.*, 1592, **11**, 309.

[176] Fearnley G. R. et Twee J.M. — *Clin. Sci.*, 1953, **12**, 81.

[177] Ferreira H.C. et Murat L.G. — *Brit. J. Haematol.*, 1963, **9**, 299.

[178] Ferry J.D., Shulman S., Gutfreund K. et Katz S. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 5709.

[179] Finlayson J.S. et Mosesson M.W. — *Biochemistry*, 1963, **2**, 42.

[180] Fischbacher W. — Fibrinolysis. Thèse Univ. Zürich, 1960.

[181] Fletcher A.P. — *Biochem. J.*, 1954, **56**, 677.

[182] Fletcher A.P. — Pathophysiology of Thrombolysis, in : « Proceedings of the Conference on Thrombolytic Agents, April 8-9, 1960, Chicago Ill. » (Roberts H.R. et Geratz, J.D., ed.), Chapel Hill, North Carolina, University of North Carolina Press, 1960, p. 148.

[183] Fletcher A.P. — *Feder. Proc.*, 1965, **24**, 822.

[184] Fletcher A.P., Alkjaersig N. et Sherry S. — *J. Clin. Invest.*, 1959, **38**, 1096.

[185] Fletcher A.P., Alkjaersig N. et Sherry S. — *Amer. J. Med.*, 1962, **33**, 738.

[186] Fleury P. et Eberhard R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1951, **9**, 453.

[187] Florkin M. — *J. Biol. Chem.*, 1930, **87**, 629.

[188] Flute T.P. — Fibrinolytic Factors as Demonstrated by Electrophoresis of Human Blood, in : « Proceedings of the 7th Congress of the European Society of Haematology, London, 1959 », Basel et New York, S. Karger, 1960, Part II, p. 894.

[189] Folk J.E. et Gladner J.A. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **44**, 383.

[190] Folk J.E., Gladner J.A. et Levin Y. — *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 2317.

[191] Forman W.B. et Barnhart M.I. — *J. Amer. Med. Assoc.*, 1964, **187**, 128.

[192] Fredericq P. — *Arch. Intern. Physiol.*, 1942, **52**, 73.

[193] Fukutake K., Shida K., Arakawa T. et Kato K. — *Blood*, 1960, **15**, 690.

[194] Gaburro D., Panizza G.F. et Bonifaci E. — *Ann. Pédiat.*, 1964, **11**, 53.

[195] Gagliardi L. — in : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 23-4, 145-6, 155-76.

[196] Gans H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, **10**, 379.

[197] Gerdes K. et Maurer W. — *Biochem. Z.*, 1957, **328**, 522.

[198] Gladner J.A., Folk J.E., Laki K. et Caroll W.R. — *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 62.

[199] Gladner J.A. et Laki K. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, **62**, 501.

[200] Godal H.C. et Helle I. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1963, **14**, 327.

[201] Godal H.C. et Luscher E.F. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1960, **12**, 47.

[202] Gormsen J. et Laursen B. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1967, **17**, 467.

[203] Gornall A.G., Bardawill C.J. et David M.M. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 751.

[204] Greig H.B.W. et Cornelius E.M. — *Nature*, 1960, **187**, 1125.

[205] Gross R., Hartl W., Kloss G. et Rahn B. — *Deut. med. Wochschr.*, 1960, **85**, 2199.

[206] Guest M.M. — *Feder. Proc.*, 1966, **25**, 73.

[207] Guest M.M. et Celander D.R. — Fibrinolytic Potential Assay, in : « Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis : Methods of Study » (Tocantins L.M. et Kazal, L.A., ed.), New York, London, Grune et Stratton Inc., 1955, p. 250-4.

[208] Guest M.M., Daly B.M., Ware A.G. et Seegers W.H. — *J. Clin. Invest.*, 1948, **27**, 785.

[209] Guest M.M. et Ware A.G. — *Science*, 1950, **112**, 21.

[210] Guillot M. et Fiehrer A. — *Biol. Méd.*, 1965, **54**, 121.

[211] Hagan J.J., Ablondi F.B. et De Renzo E.C. — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1005.

[212] Hall C.E. — *Lab. Invest.*, 1963, **12**, 998.

[213] Hall C.E. et Slayter H.S. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, **5**, 11.

[214] Hammarsten O. — *Nova Acata Regiae Soc. Sci. Upsaliensis*, Ser. III, 1876, **10**, 1.

[215] Hammarsten O. — *Upsala Läkaréfören. Forh.*, 1876, **11**, 538.

[216] Hammarsten O. — *Arch. (Pflügers) ges. Physiol.*, 1879, **19**, 563.

[217] Hammarsten O. — *Arch. (Pflügers) ges. Physiol.*, 1880, **22**, 431.

[218] Harmison C.R., Landaburu R.H. et Seegers W.H. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 1693.

[219] Harrower H.W. et Brook D.L. — *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1967, **47**, 190.

[220] Hartert H. — *Klin. Wochschr.*, 1948, **26**, 577.

[221] Hartert H. — *Klin. Wochschr.*, 1949, **27**, 789.

[222] Hartert H. — *Schweiz. med. Wochschr.*, 1949, **79**, 318.

[223] Hartert H. — *Klin. Wochschr.*, 1950, **28**, 77.

[224] Hartert H. — Thrombelastographische Untersuchungen über den Einfluss von Anticoagulantien auf die Gerinnselformierung, in : « Proceedings of the 3rd Congress of the European Society of Haematology », Rome, 1951, p. 674-8.

[225] Hartert H. — *Ztschr. exper. Med.*, 1951, **117**, 189.

[226] Hartert H. — *Verhr. deut. Ges. Kreislaufforsch.*, 1952, **17**, 562.

[227] Hartert H. — *Deut. Arch. klin. Med.*, 1952, **199**, 234-92.

[228] Hartert H. — *Deut. Arch. klin. Med.*, 1952, **199**, 293-311.

[229] Hartert H. — *Deut. Arch. klin. Med.*, 1952, **199**, 402-13.

[230] Hartert H. — *Deut. Arch. klin. Med.*, 1952, **199**, 414-22.

[231] Hartert H. — L'évaluation de la fonction des plaquettes par la thrombélastographie, in : « Proceedings of the 4th Congress of the European Society of Haematology », Amsterdam, 1953, p. 64.

[232] Hartert H. — *Klin. Wochschr.*, 1954, **32**, 139.

[233] Hartert H. — Die Thrombelastographie in der Indikation und Kontrolle der Thromboembolie-Prophylaxe und - Behandlung, in : « Première Conférence internationale sur les Thromboses et les Embolies, Bâle, 1954 », Bâle, Benno Schwabe, 1955, p. 799-803.

[234] Hartert. H. — In : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 15-23.

[235] Hartert H. — In : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 70-1.

[236] Hartert H. — In : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 89.

[237] Hartert H. — In : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 146-7.

[238] Hartert H. — In : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 153.

[239] Hartert H. — *Ztschr. klin. Med.*, 1955, **153**, 423-37.

[240] Hartert H. — Thrombelastographie, in : « Proceedings of the 7th Congress of the International Society of Haematology, Rome, 1958 », Rome, Il Pensiero Scientifico, 1960.

[241] Hartert H. — Thrombelastography: Physical and Physiological Aspects, in : « Flow Properties of Blood », Oxford, Pergamon Press, 1960.

[242] Hartert H. — Comparative Laboratory Studies on the Effect of Anticoagulants and Fibrinolysins, in : « Anticoagulants and Fibrinolysins » (MacMillan R.L. et Mustard J.F., ed.), Ontario, The Ontario Heart Foundation; London, Pitman Medical Publishing Company, 1961, p. 389-93.

[243] Haschemeyer A.E.V. — *Biochemistry*, 1963, **2**, 851.

[244] Haschemeyer A.E.V. et Nadeau R.E. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, **11**, 217.

[245] Haschemeyer A.E.V. et Tinoco I. — *Biochemistry*, 1962, **1**, 996.

[246] Hawkey C.M. et Stafford J.L. — *J. Clin. Pathol.*, 1964, **17**, 175.

[247] Heimburger N. et Schwick G. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1962, **7**, 432.

[248] Heimburger N. et Schwick G. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1962, **7**, 444.

[249] Henschen A. — *Arkiv Kemi*, 1963, **22**, 1.

[250] Henschen A. et Blombaeck B. — *Arkiv Kemi*, 1964, **22**, 347, 355.

[251] Hink Jr J.H. et MacDonald J.K. — *Vox sang*, 1963, **8**, 103.

[252] Hipp N.J., Groves M.L., Custer J.H. et MacMeekin T.L. — *J. Dairy Sci.*, 1952, **35**, 272.

[253] Hirsch J., Fletcher A.P. et Sherry S. — *Amer. J. Physiol.*, 1965, **209**, 415.

[254] Hohnen H.W. — *Z. Ges. Exptl. Med.*, 1957, **128**, 427.

[255] Holmberg C.G. — *Arkiv Kemi*, 1944, **17A**, 28.

[256] Hoermann H. et Gollwitzer R. — Hexosengehalt von Fibrinogen und Fibrin, in : « Protides of the Biological Fluids » (Peeters H., ed.), Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1964, p. 332-4.

[257] Hughes J. et Lapierre C.M. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, **11**, 327.

[258] Iatridis S.G. et Ferguson J.H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1961, **6**, 411.

[259] Jackson H.D. et Mertz E.T. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1954, **86**, 827.

[260] Jacobsson K. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1955, **7**, Suppl. 14, 55-102.

[261] Jaques L.B. — *Biochem. J.*, 1943, **37**, 344.

[262] Johnson A.J. et McCarty W.R. — *J. Clin. Invest.*, 1959, **32**, 1627.

[263] Johnson A.J. McCarty W.R., Tillet W.S., Tse A.O., etc. — Fibrinolytic, Caseinolytic and Biochemical Methods for the Study of Thrombolysis in Man : Application and Standardization, in : « Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis : Methods of Study » (Tocantins L.M. et Kazal L.A., ed.), New York, London, Grune et Stratton Inc., 1955, p. 449-503.

[264] Johnson A.J., Semar M. et Skoza L. — 10th Congress of the International Society of Haematology, Stockholm, 1964, Abstr. Public. n° G 76.

[265] Johnson A. J. et Tillet W.S. — *J. Exp. Med.*, 1952, **95**, 449.

[266] Johnson A.J., Tse A.O. et Newman J. — Preparation of Fibrinogen Deficient in Plasminogen and Determination of Clottable Protein, in : « Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis : Methods of Study » (Tocantins L.M. et Kazal L.A., ed.), New York, London, Grune et Stratton Inc., 1955, p. 462.

[267] Johnson J.F. et Seegers W.H. — Preparation of Fibrinogen, in : « Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis : Methods of Study » (Tocantins L.M. et Kazal L.A., ed.), New York, London, Grune et Stratton, 1955 p., 227-9.

[268] Johnson P. et Mihalyi E. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **102**, 467.

[269] Johnson S.A. et Schneider C.L. — *Science*, 1953, **117**, 229.

[270] Kaplan M.H. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1944, **57**, 40.

[271] Kaplan M.H. — *J. Clin. Invest.*, 1946, **25**, 331.

[272] Kaplan M.H. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1954, **85**, 142.

[273] Katz S., Gutfreund K., Shulman S. et Ferry J.D. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 5706.

[274] Kay D. et Cuddigan B.J. — *Brit. J. Haematol.*, 1967, **13**, 341.

[275] Kazal L.A., Amsel S., Miller O.P. et Tocantins L.M. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1963, **113**, 989.

[276] Keil P. — *Chem. Listy*, 1954, **48**, 725.

[277] Kekwick R.A. et Mackay M.E. — *Med. Res. Council, Spec. Rep. Ser.*, n° 286, 1954.

[278] Kekwick R.A., Mackay M.E., Nance M.H. et Record B.R. — *Biochem. J.*, 1955, **60**, 671.

[279] Kekwick R.A., Mackay M.E. et Record B.R. — *Nature*, 1946, **157**, 629.

[280] Kjeldgaard N.O. et Ploug J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **24**, 289.

[281] Kline D.L. — *J. Biol. Chem.*, 1953, **204**, 949.

[282] Kline D.L. — *Yale J. Biol. Med.*, 1954, **26**, 365.

[283] Kline D.L. — *Feder. Proc.*, 1966, **25**, 31.

[284] Kline D.L. et Fishman J.B. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2807.

[285] Kline D.L. et Fishman J.B. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 3233.

[286] Kline D.L. et Ts'Ao C.H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1967, **18**, 288.

[287] Koebele B. — Untersuchungen über die Wirkung von Thrombin auf neue synthetische Substrate. M.D. Thesis, Univ. Wien, 1962.

[288] Koller F. — *Amer. J. Cardiol.*, 1960, **6**, 367.

[289] Koller F. — La fibrinolyse physiologique, in : « VII[e] Congrès international de Thérapeutique, Genève, 6-8 octobre 1961. Les enzymes en thérapeutique. Rapports et communications », Genève, Editions Médecine et Hygiène, 1962.

[290] Kopec M., Kowalski E. et Stachurska J.. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1960, **5**, 285.

[291] Korsan-Bengsten K. et Ygge J. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1961, **13**, 591.

[292] Kowalski E., Budzynski A.Z., Kopec M., Latallo Z.S., Lipinski B. et Wegrzynowicz Z. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, **12**, 69.

[293] Kowalski E., Budzynski A.Z., Kopec M. et Murawski K. — *Blood*, 1960, **15**, 164.

[294] Kowaslki E., Kopec M. et Niewiarowski S. — *J. Clin. Pathol.* 1959, **12**, 215.

[295] Kowalski E., Kopec M. et Wegrzynowicz Z. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, **10**, 406.

[296] Kowalski E., Latallo Z.S. et Niewiarowski S. — *Sang*, 1956, **27**, 466.

[297] Kowarzyk H. — *Nature*, 1952, **169**, 614.

[298] Kowarzyk H. — *Lancet*, 1960, I, n° 7116, 176.

[299] Kunitz M. — *J. Gen. Physiol.*, 1947, **30**, 291.

[300] Kunitz M. et Northrop J.H. — *J. Gen. Physiol.*, 1936, **19**, 991.

[301] Kwaan H.C. et MacFadzean A.J.S. — *Lancet*, 1956, I, 136.

[302] Lack C.H. — *Nature*, 1948, **161**, 559.

[303] Lack C.H. et Rogers J.H. — *Nature*, 1958, **182**, 948.

[304] Lackner H. et Merskey C. — *Brit. J. Haematol.*, 1960, **6**, 402.

[305] Laki K. — *Z. (Hoppe-Seyler's) physiol. Chem.*, 1942, **95**, 273.

[306] Laki K. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **32**, 317.

[307] Laki K. — The Transition of Fibrinogen to Fibrin, in : « Blood Clotting and Allied Problems », New York, Josiah Macy Jr. Foundation, 1951, vol. 4, p. 217-60.

[308] Laki K. — *Feder. Proc.*, 1953, **12**, 471.

[309] Laki K. — *Blood*, 1953, **8**, 845-56.

[310] Laki K. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, Suppl. 13, 59.

[311] Laki K. et Gladner J.A. — *Physiol. Rev.*, 1964, **44**, 127.

[312] Laki K. et Lorand L. — *Science*, 1948, **108**, 280.

[313] Laki K. et Mester L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **57**, 152.

[314] Laki K. et Mommaerts W.F.H.M. — *Nature*, 1945, **156**, 664.

[315] Lanchantin G.F., Friedmann J.A. et Hart D.W. — *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 3276.

[316] Lanchantin G.E., Presant C.A., Hart D.W. et Friedmann J.A. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1965, **14**, 159.

[317] Landaburu R.H. et Seegers W.H. — *Amer. J. Physiol.*, 1958, **193**, 169.

[318] Laskowski M., Donnelly T.H., Van Tijn B.A. et Scheraga H.A. — *J. Biol. Chem.*, 1956, **222**, 815.

[319] Laskowski M., Rakowitz D.H. et Scheraga H.A. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 280.

[320] Lassen M. — *Acta Physiol. Scand.*, 1952, **27**, 371.

[321] Lassen M. — *Biochem. J.*, 1958, **69**, 360.

[322] Lassen M. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, **10**, 384.

[323] Lassen M. — *Acta Chem. Scand.*, 1959, **13**, 1332.

[324] Latallo Z.S., Budzynski A.Z., Lipinski B. et Kowalski E. — *Nature*, 1964, **203**, 1184.

[325] Latallo Z.S. et Walewska I. — *Rev. Hématol.*, 1959, **14**, 216.

[326] Lazar G. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1967, **17**, 401.

[327] Leclerc M. et Khodabandeh A. — *Ann. Biol. Clin.*, 1953, **11**, 596.

[328] Le Polles C.Y. et Frocrain F. — Fiches APDILA, Pharmacien biologiste, 1959, n° 13.

[329] Leroux M.E. — *Ann. Biol. Clin.*, 1953, **11**, 415.

[330] Leroux M.E. — La thromboélastographie (thrombodynamographie). Etudes théoriques, techniques, expérimentales et cliniques sur la thromboélastographie et sur quelques problèmes connexes liés à la biologie de la coagulation sanguine. Thèse Doct. Méd., Paris, 1957.

[331] Leroux M.E., Prugnaud R. et Frigot P. — *Ann. Biol. Clin.*, 1952, **10**, 142.

[332] Levin Y., Folk J.E., Gladner J.A. et Laki K. — *Feder. Proc.*, 1960, **19**, n° 1, Part 1, 332.

[333] Lewis J.H. et Ferguson J.H. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1954, **78**, 184.

[334] Lewis J.H., Ferguson E.E. et Schoenfeld C. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1961, **58**, 247.

[335] Lian C., Sassier R., Jacquet Y. et Frumesan P. — *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1936, **21**, 598.

[336] Loewy A.G. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1963, Suppl. 13, 109.

[337] Loewy A.G., Dahlberg J.E., Dorwart Jr. W.V., Weber M.J. et Eisele J. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **15**, 177.

[338] Loewy A.G., Dahlberg A., Dunathan K., Kriel R. et Wolfinger H.L. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2634.

[339] Loewy A.G., Dunathan K. Kriel R., et Wolfinger H.L. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2625.

[340] Loewy A.G. et Edsall J.T. — *J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 829.

[341] Loewy A.G., Gallant J.A. et Dunathan K. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2648.

[342] Lohmann K., Markwardt F. et Landmann H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, **10**, 424.

[343] Loomis E.C., George C. et Ryder A. — *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, 1.

[344] Lorand L. — *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1948, **1**, 192.

[345] Lorand L. — *Nature*, 1950, **166**, 694.

[346] Lorand L. — *Biochem. J.*, 1952, **52**, 200.

[347] Lorand L. — *Feder. Proc.*, 1965, **24**, 784.

[348] Lorand L., Brannen Jr W.T. et Rule N.G. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, **96**, 147.

[349] Lorand L. et Jacobsen A. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **230**, 421.

[350] Lorand L., Jacobsen A. et Fuchs L.S. — In : « Sulfur in Proteins » (Benesch, R., et coll., ed.), New York, Academic Press Inc., 1959, p. 109-24.

[351] Lorand L. et Konishi K. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, **105**, 58.

[352] Lorand L., Konishi K. et Jacobsen A. — *Nature*, 1962, **194**, 1148.

[353] Lorand L. et Middlebrook W.R. — *Biochem. J.*, 1952, **52**, 196.

[354] Lorand L. et Middlebrook W.R. — *Science*, 1953, **118**, 515.

[355] McCoy L. — *Ph. D. Thesis, Wayne State Univ., Detroit, Mich.*, 1966.

[356] MacFarlane R.G. — *Lancet*, 1937, **I**, 10.

[357] MacFarlane R.G. — *Brit. Med. Bull.*, 1964, **20**, 173.

[358] MacFarlane R.G et Biggs R. — *Blood*, 1948. **3**, 1167.

[359] MacFarlane R.G. et Pilling J. — *Nature*, 1947, **159**, 779.

[360] MacKay M. — *Brit. Med. Bull.*, 1964, **20**, 189.

[361] MacNichol G.P. et Douglas A.S. — *Brit. Med. Bull.*, 1964, **20**, 233.

[362] Magnusson S. — *Arkiv Kemi*, 1965, **24**, 349.

[363] Mandelli F., Boccardi V. et Perin L. — « La Trombelastografia », Roma, Leonardo Edizioni Scientifiche, 1963.

[364] Marchal G. — *Algérie Méd.*, 1959, **63**, n° 2.

[365] Marchal G. et Leroux M.E. — *Pathol. Biol.*, 1958, **6**, 951.

[366] Marchal G., Leroux M.E. et Samama M. — *Algérie Méd.*, 1959, **63**, 1-10.

[367] Marchal G., Leroux M.E. et Samama M. — *Pathol. Biol.*, 1960, **8**, 953.

[368] Marchal G., Leroux M.E., et Samama M. — « Atlas de Thrombodynamographie », Paris, Service de Propagande, Edition, Information, 1962.

[369] Marchal G., Samama M., Leroux M.E. et Terrier E. — *Actual. Cardiol. Angéiol. Intern.*, 1960, **9**, 167.

[370] Marenzi A.D. et Gomez C.J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 409.

[371] Markus G. et Ambrus C.M. — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1673.

[372] Martin C.J., Golubow J. et Axelrod A.E. — *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 1718.

[373] Masure R., Mineur A. et Sokal G. — In : « Proceedings of the 6th Congress of the International Society of Haematology, Boston, 1956 », New York, Grune et Stratton, 1958.

[374] Maxwell R.W. et Lewandowski V. — *Anal. Biochem.*, 1962, **4**, 407.

[375] Mazzetti G.M. — In : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 42-58.

[376] Mellanby J. — *Proc. Roy. Soc., London*, 1933, **93**, 113.

[377] Ménaché D. — *Nouv. Rev. Franç. Hématol.*, 1965, **5**, 1309.

[378] Mertz E.T., Seegers W.H. et Smith H.P. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1939, **41**, 657.

[379] Mester L., Moczar E. et Laki K. — *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1963, **256**, 307.

[380] Mester L., Moczar E., Medgyesi G. et Laki K. — *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1963, **256**, 3210.

[381] Mester L., Moczar E., Vass G. et Szabados L. — *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1965, **260**, 2342.

[382] Mester L., Moczar E., Vass G. et Szabados L. — *Pathol. Biol.*, 1965, **13**, 540.

[383] Mester L., Szabados L. et Gollwitzer R. — *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1966, **262**, 1382.

[384] Middlebrook W.R. — *Biochem J.*, 1955, **59**, 146.

[385] Migne J., Zweibaum M. et Gmuer V. — *Hémostase*, 1966, **6**, 291.

[386] Mihalyi E. et Godfrey J.E. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, **67**, 90.

[387] Mihalyi E. et Godfrey J.E. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **132**, 94.

[388] Mihalyi E., Small P.A. et Cooke J.P. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, **106**, 229.

[389] Miller K.D. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1958, **2**, 189.

[390] Miller K.D. et Copeland W.H. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1962, **111**, 512.

[391] Miller K.D. et Copeland W.H. — *Vox sang.*, 1964, **9**, 231.

[392] Miller K.D. et Copeland W.H. — *Exptl. Mol. Pathol.*, 1965, **4**, 431.

[393] Miller K.D. et Van Vunakis H. — *J. Biol. Chem.*, 1956, **223**, 227.

[394] Milstone H. — *J. Immunol.*, 1941, **42**, 109.

[395] Minot G.R. — *Amer. J. Physiol.*, 1916, **39**, 131.

[396] Mirsky I.A., Perisutti G. et Davis N.C. — *J. Clin. Invest.*, 1959, **38**, 14.

[397] Mole R.H. — *J. Pathol. Bacteriol.*, 1948, **60**, 413.

[398] Mommaerts W.F. — *J. Gen. Physiol.*, 1945, **29**, 103.

[399] Morawitz P. — *Beitr. chem. Physiol. Pathol.*, 1906, **8**, 1.

[400] Moriau M., De Vries S.I., et Dik H.J. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, **10**, 554.

[401] Morrisson P.R., Edsall J.T. et Miller S.G. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 3003.

[402] Mosesson M.W. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **57**, 204.

[403] Mosesson M.W. et Finlayson J.S. — *J. Clin. Invest.*, 1963, **42**, 747.

[404] Mosesson M.W. et Finlayson J.S. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1963, **62**, 663.

[405] Mounter L.A. et Shipley B.A. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **231**, 855.

[406] Mourad M. — Etude critique des techniques de détermination du fibrinogène, du plasminogène et de la fibrinolyse. Thèse Doct. Pharm., Paris, 1964.

[407] Muellertz S. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1954, **85**, 326.

[408] Muellertz S. — *Biochem. J.*, 1955, **61**, 424.

[409] Muellertz S. — *Acta. Physiol. Scand.*, 1956, **38**, Suppl. 130.

[410] Muellertz S. — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1957, **68**, 38.

[411] Muellertz S. et Lassen M. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1953, **82**, 264.

[412] Murray M., Johnson S.A. et Seegers W.H. — *Amer. J. Physiol.*, 1954, **178**, 10.

[413] Murray M., Johnson S.A. et Seegers W.H. — *Science*, 1954, **119**, 293.

[414] Muselet J. — Etude thrombodynamographique de la coagulation sanguine au cours du post-partum normal. Statistique de cent cas. Thèse Doct. Méd., Paris, 1958.

[415] Mutt V., Magnusson S., Jorpes E. et Dahl E. — *Biochemistry*, 1965, **4**, 2358.

[416] Nanninga L.B. et Guest M.M. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1967, **17**, 440.

[417] Neurath H., ed. — « The Proteins : Composition, Structure, and Function », 2nd Edition, New York, London, Academic Press Inc., 1965.

[418] Neurath H., Dees J.E. et Fox H. — *J. Urol.*, 1943, **49**, 497.

[419] Niewiarowski S. — *Pathol. Biol.*, 1959, **7**, 2557.

[420] Niewiarowski S. et Kowalswi E. — *Rev. Hématol.*, 1958, **13**, 320.

[421] Niewiarowski S., Kowalski E. et Kopec M. — *J. Clin. Pathol.*, 1959, **12**, 215.

[422] Niewiarowski S., Latallo Z. et Stachurska J. — *Sang*, 1959, **30**, 376.

[423] Niewiaroswki S. et Prou-Wartelle O. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1959, **3**, 593.

[424] Nilsson I.M., Sjerdsma A. et Waldenstroem H. — *Lancet*, 1960, **I**, 1322.

[425] Nitschmann H., Schlunegger U. et Schneider C. — *Vox sang.*, 1962, **7**, 641.

[426] Nolf P. — *Arch. Intern. Physiol.*, 1908, **6**, 306.

[427] Nolf P. — *Medicine*, 1938, **17**, 381.

[428] Norman P.S. — *J. Exp. Med.*, 1957, **106**, 423.

[429] Norman P.S. — *J. Exp. Med.*, 1958, **108**, 53.

[430] Norman P.S. — *Amer. J. Cardiol.*, 1960, **6**, 390.

[431] Norman P.S. et Hill M.B. — *J. Exp. Med.*, 1958, **108**, 639.

[432] Nussenzweig V. et Seligmann M. — *Rev. Hématol.*, 1960, **15**, 451.

[433] Nussenzweig V., Seligmann M. et Grabar P. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 490.

[434] Nussenzweig V., Seligmann M., Pelmont J. et Grabar P. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 377.

[435] Ogston D. et Fullerton H.W. — *Lancet*, 1961, **II**, 730.

[436] Okamoto S. — Patent specification n° 770 693, London, The Patent Office, 21 oct. 1954 (Publ. 1957).

[437] Okamoto S. — *Keio J. Med.*, 1959, **8**, 211.

[438] Okamoto S. et Okamoto U. — *Keio J. Med.*, 1962, **11**, 105.

[439] Oncley J.L. Scatchard G. et Brown A. — *J. Phys. Colloid. Chem.*, 1947, **51**, 184.

[440] Osbahr Jr A.J., Colman R.W., Laki K. et Gladner J.A. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **14**, 555.

[441] Osbahr A.J., Gladner J.A., Laki K. et Irreverre F. — *Nature*, 1964, **201**, 707.

[442] Oshida S. et Okamoto S. — *Keio J. Med.*, 1963, **11**, 117.

[443] Owren P.A. — *Acta Med. Scand.*, 1947, Suppl. 194, 327.

[444] Pantlitschko M. et Gruendig E. — *Monatsh. Chem.*, 1957, **88**, 253.

[445] Parfentjev J.A., Johnson M.L. et Cliffton E.E. — *Arch. Biochem.*, 1953, **46**, 470.

[446] Peters S. et Van Slyke D. — « Quantitative Clinical Chemistry », Baltimore, Williams et Wilkins Co., 1942, p. 696-7.

[447] Pillemer L., Ratnoff O.D., Blum L. et Lepow I.H. — *J. Exp. Med.*, 1953, **97**, 573.

[448] Ploug J. et Kjeldgaard N.O. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **24**, 278.

[449] Prost R.J. — L'amplitude maxima du thrombodynamogramme. Influence des plaquettes et du fibrinogène. Application à l'étude des anticorps antiplaquettaires. Thèse Doct. Méd., Lyon, 1959.

[450] Raby C. — « Hémostase et coagulation », Paris, Service de Propagande, Edition, Information, 1959.

[451] Raby C. — « Biologie des hémorragies et des thromboses », Paris, Masson et Cie, 1966, p. 257-8.

[452] Rasmussen P.S. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 157.

[453] Ratnoff O.D. — *J. Exp. Med.*, 1948, **87**, 199.

[454] Ratnoff O.D. — 1962, cité par Davie E.W. et Ratnoff O.D., in : « The Proteins : Composition, Structure, and Function », 2nd Edition (Neurath, H., ed.), New York, London, Academic Press Inc., 1966, vol. III, p. 359.

[455] Ratnoff O.D. et Menzie C. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, **37**, 316.

[456] Reiner M. et Cheung H.L. — *Clin. Chem.*, 1959, **5**, 414.

[457] Remmert L.F. et Cohen P.P. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **181**, 431.

[458] Richardson A. et Bishop J.G. — *Science*, 1953, **117**, 37.

[459] Riddle J.M., Bernstein M.H. et Seegers W.H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1963, **9**, 12.

[460] Robbins K.C. — *Amer. J. Physiol.*, 1944, **142**, 581.

[461] Robbins K.C. et Summaria L. — *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, 952.

[462] Robbins K.C., Summaria L., Elwyn D. et Barlow J.H. — *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 541.

[463] Roberts H.R. et Geratz J.D., ed. — « Proceedings of the Conference on Thrombolytic Agents, Chicago, Ill., April 8-9, 1960 », Chicago, Ill., The Hematology Study Section, U.S. Public Health Service ; Chapel Hill, North Carolina, University of North Carolina Press, 1960.

[464] Ronwin E. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1956, **34**, 1169.

[465] Ronwin E. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **33**, 326.

[466] Ronwin E. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **38**, 258.

[467] Ronwin E. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1962, **40**, 57.

[468] Rubinsteim H.M. — *Nature*, 1957, **180**, 1202.

[469] Samama M., Caen J., Larrieu M.J. et Manet J. — « Méthodes d'exploration de l'hémostase », Paris, Polycopie Gilanne, 1965.

[470] Samama M. et Yver J. — *Hémostase*, 1962, **2**, 55.

[471] Sanger F. — *Proc. Chem. Soc., London*, 1963, 76.

[472] Sawyer W.D., Fletcher A.P., Alkjaersig N. et Sherry S. — *J. Clin. Invest.*, 1960, **39**, 426.

[473] Scheraga H.A. et Laskowski Jr. M. — The Fibrinogen-Fibrin Conversion, in : « Advances in Protein Chemistry » (Anson M. L. et Edsall J.T., ed.), New York et London, Academic Press Inc., 1957, vol. 12, p. 1.

[474] Scheuring H. — *Biochem. Z.*, 1937, **291**, 385.

[475] Schmidt A. — *Arch. (Pflügers) ges. Physiol.*, 1872, **4**, 413.

[476] Schneider C.L. — *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 1952, **64**, 141.

[477] Schultz R.L., Moorman J.A., Ma' oush L.O. et Lincoln A.F. — *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1957, **94**, 198.

[478] Schultz R.L. et Von Kaulla K.N. — *Biochem. J.*, 1958, **68**, 218.

[479] Schultze H.E. et Schwick G. — *Ztschr. phys Chem.*, 1951, **289**, 26.

[480] Seegers W.H. — Cité par Blombaeck in [68].

[481] Seegers W.H., Casillas G., Shepard R.S., Thomas W.R. et Halick P. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1959, **37**, 775.

[482] Seegers W.H., Harmison C.R., Ivanovic N. et Heene D. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1966, **15**, 343.

[483] Seegers W.H., Levine W.G. et Shepard R.S. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1958, **36**, 603.

[484] Seegers W.H., Levine W.G. et Vandenbelt J.M. — *Arch. Biochem.*, 1945, **6**, 85.

[485] Seegers W.H. et Loomis E.C. — *Science*, 1946, **104**, 461.

[486] Seegers W.H., Nieft M.L. et Vandenbelt J.M. — *Arch. Biochem.*, 1945, **7**, 15.

[487] Seegers W.H. et Smith H.P. — *Amer. J. Physiol.*, 1942, **137**, 348.

[488] Seibert F.B., Pfaff M.L. et Seibert M.V. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1948, **18**, 279.

[489] Sgouris J.T., Brackenbury D.W., MacCall K.B. et Anderson H.D. — *Feder. Proc.*, 1962, **21**, 35.

[490] Sgouris J.T., Inman J.K., MacCall K.B., Hyndman L.A. et Anderson H.D. — *Vox sang.*, 1960, **5**, 357.

[491] Shainoff J.R. et Page I.H. — *Circulation Res.*, 1960, **8**, 1013.

[492] Shainoff J.R. et Page I.H. — *J. Exp. Med.*, 1962, **116**, 687.

[493] Sherry S. et Alkjaersig N. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1957, **1**, 264.

[494] Sherry S. et Troll W. — *J. Biol. Chem.*, 1954, **208**, 95.

[495] Sherry S., Troll W. et Glueck H. — *Physiol. Rev.*, 1954, **34**, 736.

[496] Shulman N.R. — *J. Biol. Chem.*, 1955, **213**, 655.

[497] Shulman S. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 5846.

[498] Shulman S. — *Feder. Proc.*, 1955, **14**, 281.

[499] Shulman S. — Biophysical Studies of Plasminogen and Its Activators, in : « Proceedings of the Conference on Thrombolytic Agents, Chicago, Ill., April 8-9, 1960 » (Roberts H.R. et Geratz J.D., ed.), Chicago, Ill., The Hematology Study Section, U.S. Public Health Service.

[500] Shulman S., Alkjaersig N. et Sherry S. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 91.

[501] Shulman S. et Tagnon H.J. — *J. Biol. Chem.*, 1950, **186**, 69.

[502] Sigg P. — *Thrombos. Diathes. Heamorrh.*, 1966, **15**, 238.

[503] Sjoequist J., Blombaeck B. et Wallen P. — *Arkiv Kemi*, 1960, **16**, 425.

[504] Smith H.P., Warner E.D., et Brinkhous K.M. — *J. Exp. Med.*, 1937, **66**, 801.

[505] Sobel G.W., Mohler S.R., Jones N.W., Dowdy A.B.C. et Guest M.M. — *Amer. J. Physiol.*, 1952, **171**, 768.

[506] Sokal G. — *Rev. Belge Pathol. Méd. Exp.*, 1957, **3**, 220.

[507] Sokal G. — « Plaquettes sanguines et structure du caillot. Etude morphologique et thromboélastographique », Paris, Librairie Maloine, 1960.

[508] Soulier J.P., Bernard J., Bousser J., Dreyfus B., Hamburger J. et Pequignot H. — *Presse méd.*, 1964, **72**, 167.

[509] Soulier J.P., Mathey J., Le Bolloch A.G., Daumet P. et Fayet H. — *Rev. Hématol.*, 1952, **7**, 30.

[510] Soulier J.P., Prou-Wartelle O. et Dormont Y. — *Rev. Hématol.*, 1960, **15**, 431.

[511] Sovinsky R., Oharenko L. et Koenig V.L. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 6193.

[512] Stefanini M. et Dameshek W. — « The Hemorrhagic Disorders: A Clinical and Therapeutic Approach », 2nd Edition, New York, Grune et Stratton, 1962.

[513] Steichele D.F. et Herschlein H.J. — *Med. Welt*, 1961, 2170.

[514] Steiner R.F. et Laki K. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **34**, 24.

[515] Stenhagen E. — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 714.

[516] Strassle R. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1963, **8**, 112.

[517] Straughn W. et Wagner R.H. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1966, **16**, 198.

[518] Studi di Trombelastografia, Atti del 1° Simposio sulla Trombelastografia, Pavia, 24 octobre 1954. Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955.

[519] Svedberg T. et Pederson K.O. — « The Ultracentrifuge », London, New York, Oxford University Press, New York, Johnson Reprint Corp., 1940.

[520] Szara S. et Badgy D. — *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1953, **4**, 229.

[521] Szara S. et Bagdy D. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **11**, 313.

[522] Tagnon H.J., Schulman P., Whitemore W.F. et Kravitz S.V. — *J. Clin. Invest.*, 1952, **31**, 666.

[523] Tagnon H.J. et Soulier J.P. — *Blood*, 1948, **3**, 1161.

[524] Teger-Nilsson A.C. — 1966, observations non publiées, citées in [68].

[525] Terrier E. — Les anticoagulants circulants dans l'hémophilie (inhibiteurs antithromboplasminogènes). Etude clinique et biologique. Intérêt de la thrombodynamographie dans leur détection. Etude critique des techniques classiques. A propos de 5 cas. Thèse Doct. Méd., Paris, 1959.

[526] Theling G.H. et Wagner R.H. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1959, **1**, 219.

[527] Thornes R.D. — *J. Clin. Pathol.*, 1963, **16**, 87.

[528] Thornes R.D. — *J. Irish. Med. Assoc*, 1963, **53**, 194.

[529] Tillet W.S. et Garner R.L. — *J. Exp. Med.*, 1933, **58**, 485.

[530] Tocantins L.M. — *Medicine*, 1938, **17**, 155.

[531] Tocantins L.M. et Kazal L.A. ed. — « Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis: Methods of Study », New York, London, Grune et Stratton Inc., 1955.

[532] Traisnel-Doumer J. — *Pharmacien biologiste*, 1960, n° 17.

[533] Triantaphyllopoulos D.C. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1958, **36**, 249.

[534] Triantaphyllopoulos D.C. — *Feder. Proc.*, 1965, **24**, 800.

[535] Triantaphyllopoulos D.C. et Triantaphyllopoulos E. — *Life Sci.*, 1967, **6**, 601.

[536] Tristram G.R. — *Adv. Protein Chem.*, 1949, **5**, 83.

[537] Tristram G.R. — The Amino Acid Composition of Proteins, in : « The Proteins : Chemistry, Biological Activity, and Methods » (Neurath H. et Bailey K., ed.), New York, Academic Press Inc., 1953, vol. 1A p. 181-233.

[538] Troll W. et Sherry S. — *J. Biol. Chem.*, 1955, **213**, 881.

[539] Troll W., Sherry S. et Wachman J. — *J. Biol. Chem.*, 1954, **208**, 85.

[540] Tyler H.M. et Lack C.H. — *Clin. Sci.*, 1965, **28**, 527.

[541] Vairel E., Lande M. et Léger L. — *Presse méd.*, 1964, **72**, 945.

[542] Vairel E., et Thely M. — *Ann. Biol. Clin.*, 1960, **18**, 363.

[543] Vairel E. et Thely M. — Etude de l'activité d'inhibiteurs de protéases naturels sur diverses enzymes pancréatiques et sanguines, in : « VII^e Congrès international de Thérapeutique, Genève, 6-8 octobre 1961. Les enzymes en thérapeutique. Rapports et communications » Genève, Editions Médecine et Hygiène, 1962.

[544] Vairel E., Thely M. et Choay J. — *Sem. Hôp., Paris*, 1960, **36**, 675.

[545] Valette G. — « Précis de pharmacodynamie », Paris, Masson et Cie, 1964.

[546] Vaux Saint-Cyr (C. de). — *Biol. Méd.*, 1963, **52**, 611.

[547] Vecchietti G. — *Riv. Ost. Ginecol.*, 1954, **9**, 138.

[548] Vecchietti G. — In : « Studi di Trombelastografia », Pavia, Edizioni di Haematologica, 1955, p. 95-108.

[549] Vincent D., Segonzac G. et Lacroix R. — *Ann. Biol. Clin.*, 1962, **20**, 673 ; *Presse méd.*, 1962, **70**, 2580.

[550] Virchow R. — *Arch. (Virchows) Pathol. Anat. Physiol.*, 1847, **1**, 5.

[551] Von Clauss A. — *Acta Haematol.*, 1957, **17**, 237.

[552] Von Kaulla K.N. — *Klin. Wochschr.*, 1957, **35**, 667.

[553] Von Kaulla K.N. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, **96**, 4.

[554] Von Kaulla K.N. — « Chemistry of Thrombolysis : Human Fibrinolytic Enzymes », Springfied, Ill., Charles C. Thomas Publisher, 1963.

[555] Von Kaulla K.N. et MacDonald T.S. — *Blood*, 1958, **13**, 811.

[556] Von Kaulla K.N. et Schultz R.L. — *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1958, **29**, 104.

[557] Von Kaulla K.N. et Smith R.L. — *Nature*, 1961, **190**, 449.

[558] Von Kaulla K.N. et Smith R.L. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1961, **106**, 530.

[559] Von Kaulla K.N. et Weiner R.M. — *Feder. Proc.*, 1953, **12**, 149.

[560] Von Kaulla K.N. et Weiner R.M. — *Blood*, 1955, **10**, 362.

[561] Von Korff R.W., Pollara B., Coyne R., Runquist J. et Kappoor R. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **74**, 698.

[562] Vries S.I. de, Braat Van Straaten M.A.J., Mueller E. et Wettermark M. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1961, **6**, 445.

[563] Wallen P. — *Arkiv Kemi*, 1962, **19**, 451.

[564] Ware A.G., Guest M.M. et Seegers W.H. — *Arch. Biochem.*, 1947, **13**, 231.

[565] Warren B.A. — *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 1963, **44**, 365.

[566] Whitaker J.R. — *Anal. Chem.*, 1963, **35**, 1950.

[567] Winzler R.J. — Glycoproteins, in : « The Plasma Proteins » (Putnam, F.W., ed.), New York, Academic Press Inc., 1960, vol. 1, p. 318.

[568] Zucker M.B. — *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1964, Suppl. 13, 301.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS SUR LA THROMBO-ÉLASTOGRAPHIE . . . 3

Constantes des diagrammes de coagulation 5
1. Constante *r* 5
2. Constante *am* 5
3. Constante *k* 5
4. Angle α et tangente α 5

Constantes des diagrammes de fibrinolyse 6
1. Temps de lyse 6
2. Aire de lyse. 8
3. Variation de l'amplitude. 8
4. Tangente de l'angle de lyse 8

INTRODUCTION 9

CHAPITRE I. — **BIOCHIMIE DE LA FIBRINO-FORMATION ET DE LA FIBRINOLYSE. ETAT ACTUEL DE LA QUESTION** 13

I. — BIOCHIMIE DE LA FIBRINO-FORMATION 14

A. — **Etude des différents facteurs intervenant au cours de la fibrino-formation** 14
1. Fibrinogène ou facteur I 15
2. Thrombine. 20
3. Facteur stabilisant la fibrine ou facteur XIII. 25
4. Rôle du calcium, du *p*H et de la température 26

B. — **Mécanismes de la réaction de transformation du fibrinogène en fibrine** 27
1. Formation de monomères de fibrine avec libération de fibrinopeptides 28
a) Formation des fibrinonopeptides. 28
b) Formation du monomère de fibrine. 31
2. Polymérisation des monomères de fibrine, polymères intermédiaires et polymères irréversibles 33

Pages

II. — BIOCHIMIE DE LA FIBRINOLYSE 35

A. — **Etude des différents facteurs intervenant dans la fibrinolyse** 35

1. Fibrine 35

2. Plasmine 36

3. Plasminogène 39

B. — **Fibrinolyse. Mécanisme de la réaction** 43

1. Produits de la réaction 44

2. Activation et inhibition de la fibrinolyse 48

III. — MÉTHODES DE MESURE DE LA FIBRINO-FORMATION ET DE LA FIBRINOLYSE 48

CONCLUSION 52

CHAPITRE II. — **ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE GLOBALE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE. ÉTUDE PARALLÈLE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE PAR LES MÉTHODES ENYZMATIQUES** 53

INTRODUCTION. 54

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE GLOBALE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE 55

I. — ÉTUDE ANALYTIQUE DE LA FIBRINO-FORMATION AU THROMBO-ELASTOGRAPHE 55

A. — **Choix d'une dose de thrombine** 55

B. — **Choix d'une qualité et d'une dose de fibrinogène** . . . 61

C. — **Détermination du pH optimum** 69

D. — **Influence des ions calcium** 71

E. — **Description de la technique adoptée. Etude de la reproductibilité du tracé**. 74

1. Description de la méthode 74

2. Etude de la reproductibilité du tracé 75

II. — ÉTUDE AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE DE LA LYSE DU CAILLOT DE FIBRINE. 76

A. — **Modifications à apporter à la technique précédente en vue de l'étude au thrombo-élastographe**. 76

B. — **Etude au thrombo-élastographe de l'action fibrinolytique de la plasmine**. 80

1. Effet fibrinolytique de la plasmine, sans incubation préalable 80

2. Effet de la plasmine après incubation préalable avec le fibrinogène. Interférences entre fibrinogénolyse et fibrinolyse 90

Pages

C. — **Etude au thrombo-élastographe de la lyse du caillot de fibrine par activation du plasminogène** 97

1. Mise en évidence de la présence de plasminogène dans les préparations commerciales de fibrinogène bovin et étude au thrombo-élastographe de l'activation par la streptokinase 97

a) Mise en évidence de la présence de plasminogène à l'aide de streptokinase 97

b) Influence de la concentration en streptokinase sur la lyse du caillot de fibrine 99

2. Purification en vue de l'obtention d'un fibrinogène bovin exempt de plasminogène 104

a) Différents procédés de purification du fibrinogène. . 104

b) Purification sur Séphadex 105

c) Purification selon la méthode de Mosesson 107

3. Etude thrombo-élastographique de la lyse du caillot de fibrine préparé à partir du fibrinogène purifié exempt de plasminogène. 108

D. — **Etude au thrombo-élastographe de la lyse du caillot de fibrine par action de la trypsine ou de la chymotrypsine**. 114

ÉTUDE PARALLÈLE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE PAR LES MÉTHODES ENZYMATIQUES 120

I. — MÉTHODE CASÉINOLYTIQUE 120

A. — **Principe de la méthode caséinolytique utilisée** 121

B. — **Description de la méthode** 121

1. Préparation de caséine purifiée 121

2. Détermination de l'activité caséinolytique des différents enzymes utilisés 121

3. Elaboration d'une courbe étalon de tyrosine 124

C. — **Résultats** 124

1. Courbe étalon de tyrosine. 124

2. Fibrinolysine Merck. 124

3. Lysofibrine Novo. 125

4. Plasminogène NBC 125

5. Trypsine et chymotrypsine 126

D. — **Tableau récapulatif de l'activité caséinolytique des différents enzymes étudiés**. 128

II. — MÉTHODE DE MESURE DE LA FIBRINO-FORMATION ET DE LA FIBRINOLYSE PAR DOSAGE DE LA FIBRINE 132

A. — **Description de la méthode utilisée** 134

Pages

B. — **Application de la méthode utilisée à l'étude de la fibrino-formation** 137
1. Mode opératoire 137
2. Influence de la concentration en thrombine. 138
3. Influence des ions calcium 140
4. Dosage de la fibrine formée à partir de différentes préparations de fibrinogène. 142

C. — **Application de la méthode à l'étude de la fibrinolyse** . . . 143
1. Modifications à apporter à la technique précédente en vue de l'étude de la lyse du caillot 143
2. Etude de l'action fibrinolytique de la plasmine 144
a) Effet fibrinolytique de la plasmine sans incubation préalable. Lyse du caillot de fibrine 144
b) Effet de la plasmine après incubation préalable avec le fibrinogène. Fibrinogénolyse et fibrinolyse 149
c) Détermination de l'activité fibrinolytique sur une préparation purifiée de fibrinogène exempt de plasminogène 150
3. Etude de la fibrinnolyse par activation du plasminogène . 151
a) Effet de concentrations variables en streptokinase sur la fibrinolyse 152
b) Courbe de dosage du plasminogène sur le fibrinogène bovin purifié 156

D. — **Tableau récapitulatif des activités fibrinolytiques des différents enzymes étudiés** 158

CHAPITRE III. — **CONFRONTATION DES RÉSULTATS OBTENUS AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE ET PAR LES MÉTHODES BIOCHIMIQUES**. 161

INTRODUCTION. 162

DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS AU THROMBO-ÉLASTOGRAPHE. 163

A. — **Fibrino-formation (fibrinogène non purifié)**. 163

B. — **Fibrinolyse (fibrinogène non purifié)**. 163
1. Streptokinase. 163
2. Lysofibrine Novo 165
3. Fibrinolysine Merck. 165
4. Chymotrypsine Armour 169
5. Trypsine Armour. 171

C. — **Fibrinolyse (fibrinogène purifié)**. 171
1. Fibrinolysine Merck. 172
2. Lysofibrine Novo. 174
3. Activité plasminique à unités caséinolytiques égales . . . 174

Pages

CONFRONTATION DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LA MÉTHODE BIOCHIMIQUE 176

A. — **Fibrino-formation** 176

B. — **Fibrinolyse** 176

1. Cinétique de la réaction 177

2. Influence de la préparation enzymatique utilisée . . . 179

a) Lysofibrine Nobo 179

b) Streptokinase Behringwerke 180

3. Variations en fonction de la concentration en enzyme . . 182

COROLLAIRE 185

CONCLUSION 188

BIBLIOGRAPHIE 193

Imprimerie Lebois-Typo - Bar-sur-Aube - Dépôt légal : 2e trimestre 1968 - N° 3795